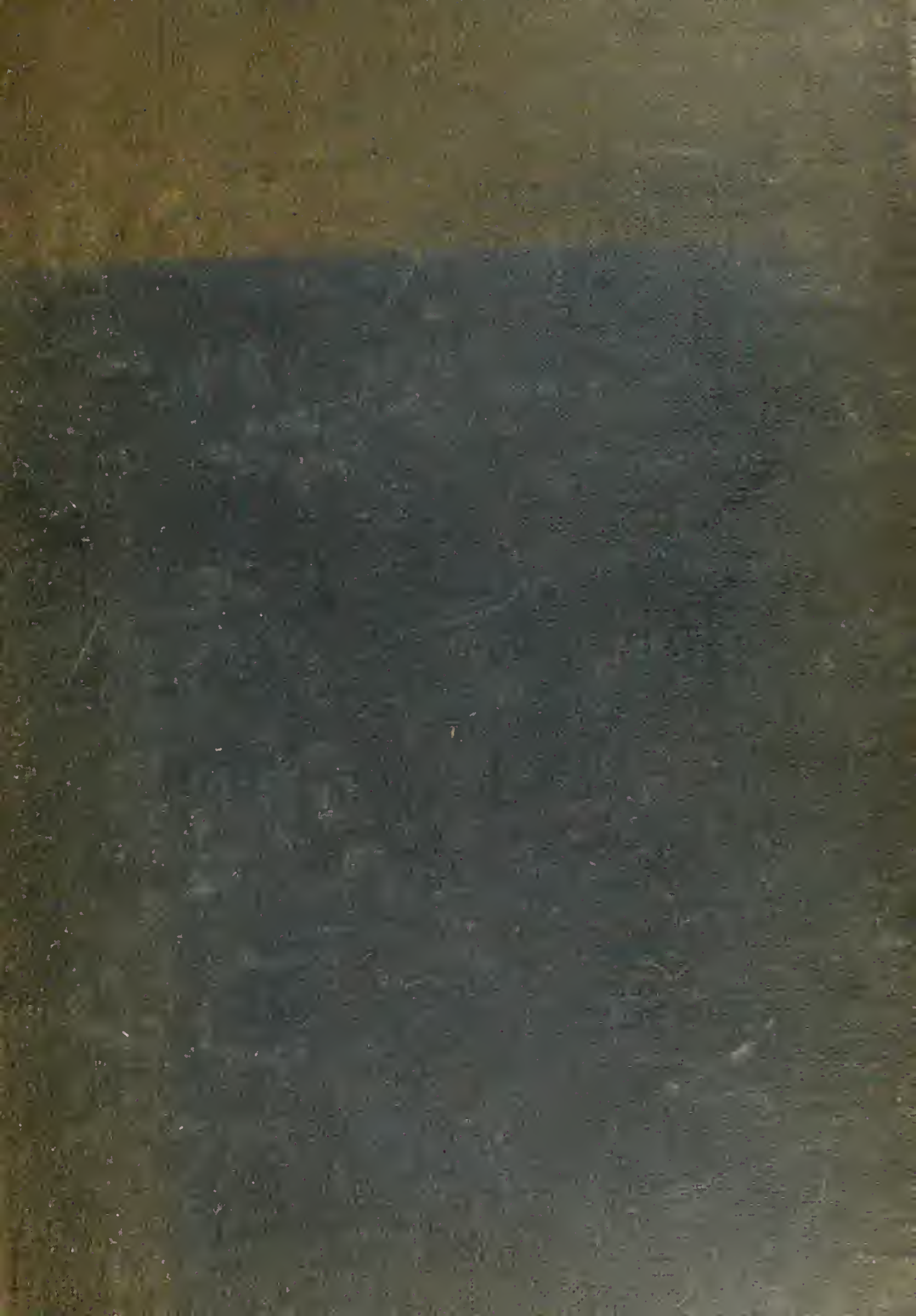
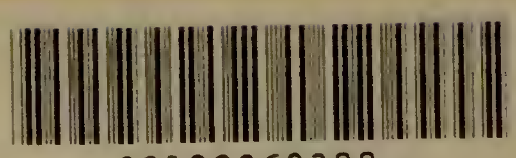





LIBRARY







Das Tuscheverfahren

als einfaches Mittel zur Lösung einiger
schwieriger Aufgaben der Bakterioskopie

(Absolute Reinkultur, Spirochaetennachweis u. a. m.)

Von

Prof. Dr. Robert Burri
Vorstand der schweiz. milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt
in Bern

Mit 3 Figuren im Text und 16 Photogrammen auf 3 Tafeln



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1909

Inhalt.



Einleitung.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß die mit beispielloser Schnelligkeit erreichte Höhe der Entwicklung, deren sich Gärungsphysiologie, Bakteriologie und verwandte Wissensgebiete zu erfreuen haben, aufs engste mit der vor ungefähr einem Vierteljahrhundert erfolgten Einführung rationeller Methoden zur Isolierung und Züchtung der mikroskopisch kleinen Lebewesen verknüpft ist. Als unabhängig voneinander wirkende Schöpfer solcher Methoden haben wir Emil Christian Hansen und Robert Koch zu betrachten. Der erstere hat durch Einführung seiner Einzellkultur für das Studium der Sproßpilze erstmals eine sichere Grundlage geschaffen und damit eine förmliche Umgestaltung der Gärungsgewerbe, vorab der Brauerei, hervorgerufen. Der letztere lehrte uns die in Boden, Wasser, Luft, in Krankheitsherden usw. vorhandenen Bakteriengemische durch verblüffend einfache Mittel in ihre einzelnen Elemente trennen und ermöglichte so die Entdeckung und genaue Untersuchung der verschiedenen für den Kreislauf des Stoffes so wichtigen Arten, sowie der zahlreichen Krankheitserreger.

Die Hansensche Einzellkultur sowie das Kochsche Plattenverfahren bedienen sich des klassisch gewordenen Hilfsmittels der festen, durchsichtigen und schmelzbaren Nährböden. Was die beiden Verfahren unterscheidet, ist, abgesehen von einigen Aeußerlichkeiten, weniger in ihnen selbst als in der Art der voneinander zu trennenden Mikroorganismen zu suchen. In der Gärungsindustrie sind es die Sproßpilze, welche im Mittelpunkt des Interesses stehen und für diese hat Hansen sein Reinzuchtverfahren ausgearbeitet. Die Größe dieser Organismen erlaubt es, mit Hilfe des Mikroskops den in geeigneter Verdünnung mit dem Aussaatmaterial beschickten und in dünner Schicht auf der Unterseite eines Deckglases aufgetragenen Nährboden nach einzelnen isoliert gelegenen Zellen abzusuchen, die betreffenden Stellen zu markieren und so nach eingetretenem Wachstum Kolonien zu erhalten, die mit absoluter Gewißheit als Nachkommenschaft einer einzigen Zelle bezeichnet werden dürfen. Diese Gewißheit vermag uns das Kochsche Plattenverfahren nicht zu geben. Die hier in erster Linie in Betracht fallenden Mikroorganismen, die Bakterien, sind im allgemeinen viel zu klein, um in der Nährbodenschicht mit Hilfe des Mikroskops noch erkannt werden zu können. Neben den geringen Dimensionen sind es die ungünstigen Lichtbrechungsverhältnisse, welche das Auffinden einer einzelnen, auf oder in der Nährbodenschicht befindlichen Bakterienzelle in der Regel unmöglich machen. Nichtsdestoweniger hieße es die Leistungsfähigkeit des Kochschen Verfahrens unterschätzen, wollte man in dem Mangel

der mikroskopischen Kontrolle des Ausgangs von der einzelnen Zelle einen schwerwiegenden prinzipiellen Fehler erblicken, der geeignet ist, den mit diesem Verfahren gewonnenen Ergebnissen im allgemeinen den Stempel der Unsicherheit aufzudrücken. Die großartigen Erfolge, welche das Kochsche Isolierungsprinzip in seinen verschiedenen Anwendungsformen sowohl auf dem Gebiete der pathologischen, wie der technischen Bakteriologie zu verzeichnen hat, sprechen ohne weiteres gegen eine solche Auffassung. Dieser Sachverhalt hängt offenbar damit zusammen, daß das Bemühen, mit Hilfe des Kochschen Verfahrens ein Keimgemisch in seine Elemente zu trennen, im allgemeinen geradeso zu wirklichen Reinkulturen führt, wie das exaktere Verfahren von Hansen. Es scheint, daß die beim Kochschen Verfahren an Stelle der absoluten Gewißheit tretende Voraussetzung, daß die bei geeigneter Verdünnung auf den Platten auftretenden zerstreuten Kolonien ihren Ursprung dem Vorhandensein je eines einzelnen Keimes verdanken, meistens eine zutreffende ist. In zweifelhaften Fällen hat man es übrigens in der Hand, durch Wiederholung des Plattenverfahrens dem trennenden Prinzip eine größere Schärfe zu verleihen, die jedoch niemals an jene absolute Zuverlässigkeit heranreicht, durch welche das Hansensche Verfahren ausgezeichnet ist.

In diesem Mangel an absoluter Gewißheit über den Ursprung der Kolonie aus einer einzigen Zelle liegt der wesentliche Gegensatz des Kochschen gegenüber dem Hansenschen Verfahren. Das letztere benützt nur Kolonien, die wirkliche Einzellkulturen sind, während die Kolonien der Kochschen Platte im allgemeinen mit großer Wahrscheinlichkeit aus einer einzelnen Zelle sich entwickelt haben.

Nun ist verständlich, daß uns für gewisse Zwecke eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit dieselben Dienste leisten kann, wie die absolute Gewißheit, während für bestimmte andere Zwecke eine auch noch so hohe, die Gewißheit sozusagen streifende Wahrscheinlichkeit die absolute Gewißheit niemals zu ersetzen vermag. So liegen die Verhältnisse beim Kochschen Plattenverfahren. Während man sich für die gewöhnlichen Isolierungs- und Keimzählungsarbeiten ohne Nachteil mit der Annahme bescheidet, daß die entstandenen Kolonien auf die Entwicklung je eines Keimes zurückzuführen seien, gibt es Fälle, in denen sich die Frage, ob eine bestimmte Kolonie ihren Ursprung einem einzelnen oder mehreren Keimen verdanke, gebieterisch in den Vordergrund drängt, wo also der Mangel einer mikroskopischen Kontrolle sich in fühlbarer Weise bemerkbar macht. An Bestrebungen, hierin Abhilfe zu schaffen, d. h. auch die Isolierung der Bakterien auf jene sichere Basis zu stellen, deren sich die Hefereinkultur erfreut, hat es, wie in der folgenden Literaturübersicht gezeigt werden soll, nicht gefehlt. Es sind nicht nur jene besondern Anlässe, wie z. B. das Studium von Variations- und Vererbungsfragen, in denen der Ausgang von der einzelnen Zelle als unerläßliche Grundlage aller Versuche gefordert werden muß, sondern es ist das im Wesen jeder wissenschaftlichen Arbeit begründete Bedürfnis nach genau fixierten Ausgangspunkten, nach möglichst vollkommenen Arbeitsmethoden, welches solchen Bestrebungen ruft.

Selbst unter dem Eindrucke stehend, daß bezüglich der Isolierung der Bakterien auf absolut sicherer Grundlage noch eine Lücke auszufüllen sei, habe ich mich vor einiger Zeit mit Versuchen in genannter Richtung befaßt, als deren Ergebnis die „Tuschepunktkultur“ hervor-

gegangen ist, über welche ich in einer vorläufigen Mitteilung[1]) eine kurze Beschreibung brachte. Seit dem Erscheinen dieser Publikation habe ich vielfach Gelegenheit gehabt, das Verfahren zu verbessern und in seiner Anwendungsfähigkeit auf die verschiedensten Bakteriengruppen auszuprobieren. Bereits konnte ich auch, gemeinschaftlich mit meinem Mitarbeiter J. Thöni[2]), über einen greifbaren Erfolg berichten, indem es uns gelungen ist, die Umwandlung normaler, nicht schleimbildender Milchsäurebakterien in intensiv schleimbildende Rassen an Hand von Einzellkulturen nachzuweisen.

Indem ich nun das Verfahren der Oeffentlichkeit übergebe, bin ich mir wohl bewußt, daß es noch in dieser und jener Beziehung der Vervollkommnung fähig ist. Immerhin leitet mich bei diesem Schritte das beruhigende Gefühl, den Fachkollegen etwas in der Hauptsache fertiges, brauchbares zu liefern. Es ist heute unter Anwendung des von mir beschriebenen Verfahrens kaum schwieriger, eine absolut sichere Reinkultur, d. h. eine unter mikroskopischer Kontrolle entstandene Einzellkultur von einem Kartoffelbacillus, einem Bact. coli, einem Micrococcus etc. zu gewinnen, als von einer Hefe.

Literaturübersicht.

In seinem Handbuch der Technischen Mykologie gibt Lafar[3]) gelegentlich der Besprechung der Einzellkultur eine Zusammenstellung von Angaben, welche sich mit der Zuverlässigkeit des Kochschen Plattenverfahrens befassen. Ich entnehme daraus folgendes: „Hansen[4]) hat unter Verwendung eines künstlich hergestellten Gemischs einer Bierhefe mit dem schon auf Grund seiner Zellgestalt allein erkennbaren Sacch. apiculatus festgestellt, daß auf den damit angefertigten Platten ungefähr 20 Proz. der herangewachsenen Kolonien unrein, d. h. aus Zellen beider Arten aufgebaut waren. J. Chr. Holm[5]) hat in besonderer Versuchsanstellung mit einer Reihe von Reinhefen, teils allein, teils in künstlich hergestellten Gemischen gezeigt, daß 100 Kolonien auf Platten von Nährgelatine nach Kochs Verfahren im schlimmsten Falle aus 135 Zellen und im Mittel aller Beobachtungen aus 108 Zellen herangewachsen waren.“ P. Miquel[6]) hat darauf aufmerksam gemacht, daß aus mehreren Bakterienarten zusammengesetzte Kolonien namentlich häufig bei Verarbeitung natürlicher Gemische, wie sie z. B. bei der Luftanalyse in Form von Staubpartikeln eine Rolle spielen, zur Beobachtung gelangen. Lafar[7]) selbst wies nach, daß gemischte Kolonien vorkommen können, welche aus Hefen und Bakterien gemeinsam aufgebaut sind.

Es kann nicht überraschen, wenn solche Untersuchungen zu stark voneinander abweichenden Ergebnissen führen, indem sich nicht nur die

1) Burri, R., Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1907, Bd. XX, p. 95.
2) Burri, R. u. Thöni, J., daselbst, 1909, Bd. XXIII, p. 32.
3) Lafar, Fr., Handbuch d. Techn. Mykologie, Bd. IV, p. 108. Jena (Gust. Fischer) 1905.
4) Hansen, E. Chr., Comptes rendus de Carlsberg, 1883, Bd. II, p. 13.
5) Holm, J. Chr., daselbst, 1891, Bd. II, p. 1.
6) Miquel, P., Mémoire de l'Observatoire de Montsouris pour 1888; ref. in Centralbl. f. Bakt., 1888, Bd. IV, p. 276.
7) Lafar, Fr., Z. f. d. ges. Brauwesen, Bd. XVII, 1894, p. 10; Bd. XX, 1897, p. 679.

einzelnen Arten der Mikroorganismen bezüglich der Verklebungsfähigkeit sehr verschieden verhalten, sondern auch innerhalb einer Art oft alle möglichen Abstufungen der Membranverschleimung festzustellen sind. In extremen Fällen der Verschleimung kann es dann geschehen, daß trotz wiederholter Anwendung des Plattenverfahrens gewisse Formen, die mikroskopisch leicht zu unterscheiden sind, mit großer Hartnäckigkeit immer wieder in ein und derselben Kolonie auftreten.

Sehen wir uns nun nach Angaben um, welche zur Herstellung von Bakterienreinkulturen von der einzelnen Zelle aus in näherer Beziehung stehen, so kämen zunächst die Einzellverfahren in Betracht, welche für größere Organismen, im besonderen für Sproßpilze, ausgearbeitet worden sind. Soweit diese Verfahren in dem die Methodik der Reinzucht behandelnden Teil der bakteriologischen Lehrbücher überhaupt Erwähnung finden, geschieht es in der Regel unter Hinweis auf ihre Verwendung bei der Reinzüchtung der Hefen und verwandter Pilze, und gelegentlich wird die Bemerkung beigefügt, daß das Prinzip der Einzellkultur für die Bakterien wegen ihrer Kleinheit leider nicht in Frage komme.

In ihrem „Traité de Bactériologie pure et appliquée" geben P. Miquel und R. Cambier[1]) folgender Meinung Ausdruck: „Il est à regretter que les bactéries ne puissent, à cause de leur petitesse, se prêter aussi facilement que les champignons au mode de sélection si précis imaginé par Hansen; nous pensons, cependant, que cela n'a rien d'impossible et que les bactéries filamenteuses, les sarcines et les grosses espèces microbiennes peuvent être séparées par la méthode de Hansen; on y parviendra en y consacrant le temps voulu et la patience que réclament toujours les manipulations délicates exécutées sous le microscope." Die genannten Autoren glauben also, daß man wenigstens bei den großen Bakterienformen mit der nötigen Geduld auch nach dem Hansenschen Verfahren zu Reinkulturen gelangen könnte.

Einen ähnlichen Standpunkt vertritt Lindner[2]), der in seinem Werke „Die mikroskopische Betriebskontrolle der Gärungsgewerbe" die Angabe macht, daß es gelinge, mit Hilfe der dort beschriebenen Tröpfchenkultur[3]) zumeist auch Bakterien-Einzellkulturen zu erhalten. In einer Mitteilung, die sich mit meiner Tuschepunktkultur befaßt, hat derselbe Autor[4]) es ausgesprochen, daß er von den großen Milchsäurebakterien zu wiederholten Malen auf dem Wege der Tröpfchenkultur Einzellkulturen erhalten habe. Ich möchte diesen Erfolg nicht in Abrede stellen, habe aber in einer weiteren den gleichen Gegenstand betreffenden Mitteilung[5]) darauf hingewiesen, daß das Problem der Einzellkultur für die große Zahl der mittleren und kleineren Bakterienarten, aus welchen sich z. B. die wichtigsten pathogenen Typen rekrutieren, bisher nicht gelöst worden sei.

1) Miquel, P. und Cambier, R., Traité de Bactériologie, p. 162. Paris (Masson et Cie.) 1902.

2) Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle der Gärungsgewebe, 4. Aufl., p. 189. Berlin (Paul Parey) 1905.

3) Die Tröpfchenkultur besteht darin, daß man mit einer feinen sterilisierten Zeichnungsfeder auf die Unterseite eines Deckglases feinste Tröpfchen oder Striche einer Nährlösung absetzt, in welcher vorher die zu isolierenden Keime in geeigneter Weise verteilt worden sind. Das Deckglas wird mit den Tröpfchen nach unten auf einen hohlen Objektträger mittelst Vaseline aufgekittet. Die einzelnen Tropfen werden mikroskopisch durchmustert und die nur eine Zelle enthaltenden markiert.

4) Lindner, P., Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., 1908, Bd. XX, p. 342.

5) Burri, R., daselbst, 1908, Bd. XXI, p. 80.

Ernst Küster[1]) fügt in seiner „Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen“ an die Besprechung der Lindnerschen Tröpfchenmethode folgende Sätze: „So lange man die in einem Tropfen suspendierten Zellen so leicht kontrollieren kann wie bei Hefen und anderen Organismen von beträchtlicher Größe, genügen diese Verfahren (Brefeld, Lindner etc.) sehr wohl. Anders wird es bei Untersuchung von Bakterien.“ (Es folgt die Besprechung des Kochschen Verfahrens.)

In gleichem Sinne äußert sich Alb. Klöcker[2]) in seinem Buche über die Gärungsorganismen, das aus dem Carlsberg-Laboratorium in Kopenhagen, der klassischen Stätte der Einzellkultur, hervorgegangen ist. Dort heißt es (S. 94 der Aufl. 1900): „In betreff der Bakterien wird man in der Regel die physiologischen Methoden zur vorbereitenden Züchtung anwenden können, im übrigen aber auf die Kochsche Plattenkultur angewiesen sein, da die Bakterien zu klein sind, um mit Sicherheit ihre isolierte Lage in der Gelatine und in Flüssigkeiten erkennen zu können.“ Also auch da, wo eine konsequente Anwendung des Prinzipes der Einzellkultur auf die Reinzüchtung sämtlicher Mikroorganismen in erster Linie erwartet werden dürfte, herrscht die Anschauung, daß mit dem Betreten des bakteriologischen Gebietes dem Arbeiten mit einzelnen Zellen aus den mehrfach erwähnten Gründen eine Grenze gesteckt sei.

Als einziger zu meiner Kenntnis gelangter positiver Vorschlag zur Herstellung von Bakterien-Einzellkulturen wäre das Verfahren von S. L. Schouten[3]) zu erwähnen. Schouten sucht dadurch zum Ziele zu gelangen, daß er unter mikroskopischer Kontrolle innerhalb einer sogenannten feuchten Kammer aus einem die Mikroorganismen in mäßiger Zahl enthaltenden Tröpfchen ein ganz winziges Tröpfchen mit nur einem Keim abtrennt und diesen in ein daneben befindliches, steriles Nährlösungströpfchen überführt. Die betreffenden Manipulationen, die bei der Kleinheit der Objekte außerordentlich subtiler Natur sein müssen, werden mit Hilfe von feinsten Glasnadeln vollzogen, welche durch seitliche Oeffnungen in das Innere der feuchten Kammer ragen und durch einen besonderen, mit dem Mikroskop verbundenen Mechanismus von außen dirigiert werden können. Wer bei dieser möglichst kurzen Charakterisierung des von Schouten vorgeschlagenen Isolierungsprinzips nicht die Empfindung hat, einer recht heiklen Aufgabe gegenüber zu stehen, der wird sicherlich beim Durchlesen der Originalabhandlung oder der von Küster in dem erwähnten Werkchen gegebenen Darstellung dahin gelangen. Mag das Verfahren, um mit Küster zu sprechen, als „ingeniös“ bezeichnet werden, praktisch ist es nicht. Es scheint mir an dem Umstand zu kranken, daß eine unendlich feine Sache mit viel zu groben Mitteln angefaßt wurde. Zwar stehen mir keine Erfahrungen zur Verfügung, welche dieses Urteil stützen könnten; im Gegenteil, ich bekenne mich offen zu denjenigen, die sich durch die Beschreibung dieses Verfahrens nicht zu einem Versuch mit der Bakterienzüchtung aus einer Zelle aufgemuntert fühlten, sondern auf ein Betreten des empfohlenen Weges von vornherein verzichteten. Daß mein Mißtrauen nicht unberechtigt war, dafür spricht einerseits die Tatsache, daß die Schoutensche Methode, obwohl sie seit einigen Jahren bekannt

---

1) Küster, E., Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen, p. 58. Leipzig u. Berlin (B. G. Teubner) 1907.

2) Klöcker, Alb., Die Gärungsorganismen, p. 94, Stuttgart (Max Waag) 1900.

3) Schouten, S. L., Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie, Bd. XXII, 1905, p. 10.

ist, noch keine nennenswerten Erfolge auf dem Gebiete der angewandten Bakteriologie zu verzeichnen hat, ferner die neulich erfolgte Mitteilung, daß jetzt für die Herstellung der für das Verfahren geeigneten Glasnadeln ein Apparat zum Preise von 100 M. erhältlich ist. Der letzte Punkt ist nicht geeignet, dem fraglichen Verfahren Freunde zu werben, vielmehr dürfte er die Schwierigkeiten ahnen lassen, die der Erreichung des Ziels im Wege stehen.

I. Das Tuscheverfahren als Grundlage einer neuen Bakterien-Einzellkultur.

1. Entstehungsgrund.

Im Laufe des Jahres 1906 war ich unter Mitwirkung meines damaligen Assistenten Dr. M. Düggeli[1]) mit der vergleichenden Untersuchung einer großen Zahl von Coli-Stämmen beschäftigt[2]). Unter anderem erstreckte sich die Prüfung dieser Stämme auch auf das Verhalten gegenüber verschiedenen Zuckerarten. Aehnlich, wie vor uns verschiedene Autoren, konnten wir die Beobachtung machen, daß sich bei Wiederholung der Versuchsreihen die Ergebnisse nicht genau deckten. Es gab Stämme, welche z. B. Saccharose gegenüber ein unbestimmtes Verhalten zeigten, indem diese Zuckerart einmal gar nicht, ein andermal deutlich, aber schwach angegriffen wurde.

Der Umstand, daß wir die einzelnen, mit verschiedenen Zuckerarten beschickten Nährböden in Form von Zuckeragar-Schüttelkulturen, also in festem Zustande, verwandten, erlaubte uns, mit aller Sicherheit die Wahrnehmung zu machen, daß bei verspätetem und schwachem Auftreten der Gärung sich nicht alle in die Kulturen ausgesäeten Keime, sondern nur ein kleinster Bruchteil dieser an der Zerlegung des Zuckers beteiligte. Denn im Innern des Nährbodenzylinders hatten sich in solchen Fällen nur ganz vereinzelte Kolonien entwickelt, die als Nachkommenschaft von Keimen aufzufassen waren, welche im Gegensatze zu der Hauptmenge der überhaupt ausgesäeten Keime den betreffenden Zucker (in diesem Falle Rohrzucker) zu zerlegen vermochten. Da eine Verunreinigung der Kulturen ausgeschlossen schien, die Befunde sich bei Wiederholung deckten und für mehrere Coli-Stämme gleicher Herkunft auffallend übereinstimmten, blieb nur die Annahme übrig, daß jeder Keim der betreffenden Stämme die Fähigkeit in sich trug, durch fortgesetzte Teilung eine Nachkommenschaft von Zellen zu erzeugen, von denen die erdrückende Mehrheit zur Vergärung eines bestimmten Zuckers nicht befähigt war, während eine verschwindend kleine Minderheit das umgekehrte Verhalten äußerte. Wir glaubten dieses Verhalten als Mutation auffassen und den von Neisser[3]) und Massini[4]) wie von Burk[5]) beobachteten Fällen an die Seite stellen

---

1) Zurzeit Vorstand des landw.-bakt. Laboratoriums am eidg. Polytechnikum in Zürich.

2) Burri, R. und Düggeli, M., Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., Orig., Bd. XLIX, 1909, p. 145.

3) Neisser, J. M., Beiheft z. Centralbl. f. Bakt., 1. Abt., Ref., Bd. XXXVII, 1906, p. 98.

4) Massini, Rud., Arch. f. Hyg., Bd. LXI, 1907, p. 250.

5) Burk, Arnold, daselbst, Bd. LXV, 1908, p. 235.

zu dürfen. Nach einer Richtung hatten unsere Versuche allerdings ein Gefühl der Nichtbefriedigung hinterlassen, und dieses erneuerte sich bei der Kenntnisnahme der Befunde der eben zitierten Autoren. Es mußte nämlich als höchst bedauerlich bezeichnet werden, daß die Beobachtungen über solche Umwandlungen physiologischer Funktionen nicht an Hand von Reinkulturen gemacht werden konnten, die ihren Ursprung nachweislich einer einzigen Zelle verdankten. Auf die Erfüllung dieser Forderung mußte aber zur Zeit einfach aus dem Grunde verzichtet werden, weil eine hierfür geeignete Methode nicht existierte. Doppelt bedauerlich erschien uns dieser Mangel, weil die gegenwärtige Entwicklungsrichtung der Bakteriologie mehr und mehr den großen Problemen der Evolutionstheorie, im besonderen dem Studium der Variabilität und der Anpassung zuneigt, ein Umstand, der sich voraussichtlich für zahlreiche Fragen der angewandten Bakteriologie als äußerst fruchtbar erweisen wird.

Was das Fehlen einer einfachen und zuverlässigen Bakterieneinzellkultur betrifft, so konnten als Gründe dieser Erscheinung verschiedene in Betracht kommen. Jedenfalls war nicht anzunehmen, daß noch niemand außer S. L. Schouten es versucht hatte, die verlockende Aufgabe zu lösen. Nur scheinen die betreffenden Bemühungen zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt zu haben, wahrscheinlich aus dem Grunde, weil von Anfang an zur Erreichung des Zieles unrichtige Wege eingeschlagen wurden. Uebrigens ist nicht außer acht zu lassen, daß das Bedürfnis nach Reinkulturen im strengsten Sinne des Wortes früher kein so ausgesprochenes war, wie zu gegenwärtiger Zeit, in welcher sich auf dem gesamten Gebiete der Mikrobiologie die Fragen und Rätsel der Entstehung der Arten an zahlreichen Punkten zugleich aufzurollen beginnen.

Mögen die Gründe für das Fehlen einer praktischen Bakterieneinzellkultur so oder so liegen, Tatsache ist, daß in den weitesten Kreisen der Bakteriologen eine gewisse Resignation in dem Sinne Platz gegriffen hatte, daß man die Hansensche Einzellkultur als ein exaktes Forschungsmittel ersten Ranges anerkannte, um dessentwillen die Gärungsphysiologen zu beneiden seien; daß aber leider auf bakteriologischem Gebiet etwas Entsprechendes fehle und wegen der Kleinheit der Organismen wohl auch nicht erwartet werden dürfe. Unter diesen wenig ermutigenden Eindrücken, die durch Schoutens Versuch eher im Sinne einer Verdüsterung beeinflußt wurden, stand ich im Herbst 1906, als meine bei gewissen Coli-Rassen angestellten Beobachtungen über Veränderlichkeit der physiologischen Funktionen so energisch der Benutzung von Einzellkulturen riefen, daß ich unter dem Drucke dieses Bedürfnisses den Entschluß faßte, die Fortsetzung der vielversprechenden Versuche nicht aufzunehmen, bis ich imstande wäre, der gedachten Forderung zu genügen.

2. Anforderungen.

Ein Verfahren, das dem Zwecke dienen soll, Reinkulturen von Mikroorganismen, speziell von Bakterien zu erzielen, die von einer einzigen Zelle stammen, muß in dem Sinne einen universellen Charakter haben, als es gleich gut für die verschiedensten Gruppen der betreffenden Organismen angewendet werden kann. Es soll geeignet sein für bewegliche und unbewegliche, für luftliebende und luftscheue, für große

und kleine Formen. Da die Grundbedingung des angestrebten Verfahrens darin besteht, daß es möglich sein soll, mit Hilfe des Mikroskops in exakter, jeden Zweifel ausschließender Weise das ursprüngliche Vorhandensein einer einzigen Zelle festzustellen, so läßt sich leicht erkennen, daß in der Berücksichtigung der bisher zur Einzellkultur benutzten Mittel eine Beschränkung Platz greifen mußte. So konnten wir dem Verfahren kleinster Tröpfchen, wie es uns in konsequenter Ausbildung der allgemein üblichen Bakterienuntersuchung „im hängenden Tropfen“ in der Lindnerschen „Tröpfchenkultur“ entgegentritt, von vornherein wenig Zutrauen entgegenbringen, denn es eignet sich nicht für die Feststellung des Vorhandenseins einer einzigen Zelle bei lebhaft beweglichen Arten. Wir mußten also, um den universellen Charakter des Verfahrens zu wahren, uns an eine Versuchsanordnung halten, die in gleicher Weise bewegliche und unbewegliche Arten zu behandeln erlaubt. Dies ist der Fall bei der Untersuchung der Bakterien in oder auf festen Medien. Um ferner die oft schwierige Behandlung der ausgesprochen anaëroben Arten nicht auf das Einzellverfahren zu übertragen, war es notwendig, von Anfang an Isolierung und Züchtung möglichst auseinander zu halten und bei der Verfolgung des angestrebten Zieles die erstere in den Vordergrund zu stellen. Die Berücksichtigung dieses Grundsatzes hat sich im Verlauf der Versuche, wie aus den folgenden Erörterungen zu entnehmen ist, als äußerst nützlich erwiesen.

3. Vorversuche.

Meine ersten Versuche, Bakterien-Einzellkulturen zu erlangen, lehnten sich an die Lindnersche Tröpfchenkultur; doch habe ich diesen Weg bald als unzureichend erkannt und verlassen. Die Schwierigkeit bestand vor allem darin, daß es nicht gelingen wollte, mit Hilfe der sterilisierten Zeichnungsfeder genügend kleine Tröpfchen auf dem Deckglas zu erzeugen. Gelang es ausnahmsweise, ein Tröpfchen von den erwünschten geringen Dimensionen zu erhalten, so verschwand es in der warmen trockenen Zimmerluft im nächsten Augenblick durch Verdunstung. In Tröpfchen, welche infolge bedeutender Größe vor diesem Schicksal bewahrt blieben ($^1/_4$—$^1/_2$ mm Dm.), erwies es sich als recht schwierig, das Vorhandensein von einzelnen Bakterien festzustellen. Bei beweglichen Arten mußte auf die Erreichung dieses Zweckes aus naheliegenden Gründen sowieso verzichtet werden, während bei unbeweglichen die Schwierigkeiten mit der Kleinheit der Formen rasch zunahmen. Das hängt einerseits damit zusammen, daß der Rand der Tröpfchen sich nicht immer mit der gleichen idealen Regelmäßigkeit ausgebildet zeigt, besonders aber mit dem Umstand, daß das Aussaatmaterial bezw. die Nährflüssigkeit selten ganz frei von verunreinigenden körperlichen Elementen ist, die von ungefärbten kleinen Mikroorganismen nur schwierig zu unterscheiden sind. Mag es in einzelnen Fällen gelingen, mit Hilfe der mikroskopischen Durchmusterung kleinster in feuchter Kammer gehaltener Nährflüssigkeitströpfchen zu Bakterien-Einzellkulturen zu gelangen, so kann doch dieses Verfahren für den genannten Zweck nicht als allgemein brauchbar bezeichnet werden. Dafür ist es, abgesehen von der Nichtverwendbarkeit bei beweglichen Arten, mit viel zu großer Unsicherheit behaftet.

Bei dieser Ueberzeugung angelangt, ging ich dazu über, die Brauchbarkeit eines anderen Prinzips zu prüfen, das, soweit es sich um die

Isolierung der Keime handelte, ebenfalls auf der Zerteilung der keimhaltigen Flüssigkeit in einzelne, womöglich nur einen Keim enthaltende Flüssigkeitströpfchen beruht. Es handelte sich um die von mir[1]) schon im Jahre 1893 bei der Herstellung von „Oberflächenplatten“ angewendete feine Zerteilung der in sterilem Wasser aufgeschwemmten Bakterien durch einen Zerstäuber. Ein solcher ermöglicht in der Tat eine Zerteilung des Wassers in Tröpfchen von einer Feinheit, wie sie mechanisch, z. B. mit Hilfe einer Zeichnungsfeder, kaum hergestellt werden können. Die Anwendung dieses Prinzips geschieht bei dem erwähnten Oberflächenplattenverfahren wie folgt: Eine mit steriler Nährgelatine oder sterilem Nähragar beschickte Petrischale wird nach dem Erstarren des Nährbodens für einige Sekunden dem vom Zerstäuber erzeugten Sprühregen des keimhaltigen Wassers ausgesetzt und dann wieder mit dem Deckel versehen. War die Verdünnung des keimhaltigen Materials eine angemessene, so fallen eine große Zahl von Tröpfchen auf den Nährboden, die keinen Keim enthalten, die geringere Zahl aber wird einen, vielleicht auch mehr Keime enthalten, und da, wo solche Tröpfchen hingefallen sind, werden später Kolonien entstehen, die, im Gegensatz zur gewöhnlichen Kochschen Platte, sich sämtlich unter genau denselben Bedingungen bezüglich des Sauerstoffzutrittes befinden und dementsprechend ein sehr einheitliches Plattenbild liefern. Das Charakteristische dieses Oberflächenplattenverfahrens besteht also darin, daß die Keime in Flüssigkeitströpfchen eingeschlossen auf den sterilen festen Nährboden gebracht werden und sich dort zu Kolonien entwickeln können. Es ist leicht einzusehen, daß bei genügender Verdünnung des Ausgangsmaterials durch steriles Wasser viele der Tröpfchen nur eine Zelle enthalten werden und so den Ausgangspunkt von Einzell-Reinkulturen bilden. Man müßte, um der letzteren habhaft zu werden, nur die gefallenen Tröpfchen sofort untersuchen und sich die Stellen des Nährbodens merken, auf welche solche mit nur einer Zelle hingelangten. Aber gerade darin liegt die Schwierigkeit. Die allerkleinsten Tröpfchen verdunsten schon in der Luft, bevor sie auf die Platte gelangen, und die kleineren unter den die Platte erreichenden sieht man nach wenigen Sekunden verschwinden, weil sie teils verdunsten, teils aber von der Nährbodenschicht aufgesaugt werden. Unterwirft man eine Nährbodenscheibe einige Minuten nach erfolgter Bestäubung der mikroskopischen Prüfung, so gelingt es in der Regel nicht, etwas von Bakterien aufzufinden, geschweige denn, den Ort festzustellen, wo einzelne Zellen in genügender Isoliertheit sitzen. Es wäre also vor allem nötig, die Orte, wo Tröpfchen hinfallen, in irgendeiner Weise zu markieren, um später Anhaltspunkte darüber zu haben, wo man nach einzelnen Zellen zu suchen hat. Diesbezüglichen Bemühungen waren die folgenden Versuche gewidmet.

Das bei den erwähnten Oberflächenplatten beschriebene Impfverfahren hatte offenbar manches gute an sich. Die mit den Tröpfchen abgesetzten Keime befanden sich nur an der Oberfläche des Nährbodens und mußten nach Bedecken mit einem Deckglase den stärksten mikroskopischen Vergrößerungen zugänglich sein. War nun der Ort, wo die Tröpfchen hingefallen waren, in geeigneter Weise markiert, so trat an Stelle des planlosen Absuchens der Platte die systematische Durchmusterung der betreffenden Stellen. Diese Markierung geschah zweck-

[1]) Burri, R., Arch. f. Hyg., Bd. XIX, 1893, p. 1.

mäßig durch Zusätze zu der keimhaltigen Aufschwemmung, welche den Keimen selbst nicht schädlich sein konnten.

Ein erster Versuch mit sehr feinpulverigem Magnesiumkarbonat befriedigte nicht, indem die Karbonatpartikel bei starker Vergrößerung viel zu grob aussahen und, obwohl sie die Lage des Tröpfchens gut beschrieben, die einzelnen Bakterien nicht gut erkennen ließen, ja sogar direkt verdeckten. Nach anderer Seite lagen die Nachteile bei Verwendung von löslichen Farben. Solche, z. B. Methylenblau, in mäßiger Konzentration der Bakterienaufschwemmung zugesetzt, färbten naturgemäß die kleinen Tröpfchen bei durchfallendem Lichte nur schwach und, was besonders zu ihren Ungunsten in die Wagschale fiel, sie erzeugten nicht ein scharf umgrenztes farbiges Feld, sondern eine blaßgefärbte Scheibe mit verwaschener Randzone, in der die Bakterien recht schwierig zu erkennen waren. Ich gewann den Eindruck, daß die Möglichkeit, auf einer festen Nährgelatinefläche liegende Bakterien mit der wünschenswerten Leichtigkeit und Sicherheit aufzufinden, nur erreicht werden kann entweder durch intensive Färbung der Bakterien selbst oder durch intensive Färbung ihrer Umgebung. Da sich das erste Mittel wegen der damit verbundenen Schädigung der Lebenskraft der Zellen von selbst verbietet, so blieb das zweite zu versuchen.

In Erinnerung eines in der älteren Literatur öfters erwähnten Verfahrens zum Nachweis von Schleimhüllen bezw. Kapseln bei Bakterien griff ich zur Tusche, und zwar wählte ich der Bequemlichkeit halber die überall erhältliche flüssige Perltusche von Günther Wagner (Hannover und Wien). Von diesem Präparat setzte ich versuchsweise eine gewisse Menge zu der wässerigen Bakterienaufschwemmung und zerstäubte das vollständig schwarze Flüssigkeitsgemisch über einer sterilen Gelatineplatte. Wie gewohnt, verdunsteten die aufgefallenen Tröpfchen sofort, aber nachher fand sich an Stelle eines jeden ein schwarzer Punkt von geringerer oder größerer Ausdehnung. Die kleinsten waren mit unbewaffnetem Auge kaum zu erkennen. Die Orte der Platte, an welchen sich Keime überhaupt befinden konnten, waren hier anscheinend mit aller Schärfe markiert, und die mikroskopische Untersuchung bestätigte dies. Da war keine diffus verlaufende Randzone, sondern eine scharfe Grenzlinie trennte die klare lichtdurchflutete Gelatine von dunkelbraunen Scheiben, dem Eintrocknungsrückstande der ursprünglich vorhandenen schwarzen Tröpfchen. Eine überaus angenehme Ueberraschung bot mir aber die nähere Untersuchung der Tuschescheibchen. Nach Auflegen eines Deckglases ließen sich schon bei schwacher Vergrößerung in den meisten unter ihnen hellleuchtende, feinste Elemente erkennen, die sich bei starker Vergrößerung in Bakterien umwandelten, welche sich sauber und blendend weiß genau so von der braunen Umgebung abhoben, wie sich die Bakterien irgendeines gelungen gefärbten Reinkulturpräparates vom weißen Untergrund abzuheben pflegen. Diese Beobachtung bedeutete zweifelsohne einen Erfolg auf dem Wege zum vorgesteckten Ziele. In der erwähnten Art der Anwendung von Tusche war die Möglichkeit gegeben, in einem scharf umgrenzten, kleinen, der mikroskopischen Untersuchung leicht zugänglichen Feld das Vorhandensein einer bestimmten Zahl von Bakterien mit unzweifelhafter Sicherheit festzustellen.

Die weitere wichtige Frage, ob die in den Tuschescheibchen gesehenen Bakterien (es handelte sich um Bact. coli) auch noch lebenskräftig seien, war schon am folgenden Tage entschieden. Als ich die betreffende Platte wieder der mikroskopischen Beobachtung unterzog, bot sich mir eine weitere Ueberraschung. An Stelle der am Tage zuvor gesehenen Stäbchen waren jetzt lauter junge Kolonien getreten, die aus je 4—12 Stäbchen bestanden, welche einzeln ziemlich gut zu unterscheiden waren, obwohl zwischen ihnen und dem Deckglas das Tuschescheibchen lag, während das Mutterstäbchen, welches direkt mit dem Deckglas in Berührung war, sich durch starkes Aufleuchten von seiner Nachkommenschaft unterschied. Nach weiteren 12 Stunden zählten die Stäbchen jeder einzelnen Kolonie bereits zu Hunderten und die Tuschescheibe zeigte sich stellenweise durch Druck und Verschiebung mechanisch gestört. Für eine wichtige Gruppe von Bakterien war mit den erwähnten Feststellungen die Frage der Einzellkultur im Prinzip gelöst. Man braucht nur eine Bakterienaufschwemmung von genügender Verdünnung mit Tusche zu versetzen und nach dem Zerstäubungsverfahren in angegebener Weise zu verarbeiten. Unmittelbar nachher sucht man unter den schwarzen Punkten der Platte solche aus, die einen einzelnen Keim enthalten, läßt diesen sich zur Kolonie entwickeln und impft nach behutsamer Entfernung des Deckglases in gewöhnlicher Weise ab.

Nun haften diesem Verfahren zwei Uebelstände an, deren Beseitigung eine ganz wesentliche Verbesserung bedeuten würde. Der eine fällt zusammen mit der Schattenseite des von mir beschriebenen Oberflächen-Plattenverfahrens und besteht darin, daß man beim Zerstäuben der wässerigen Bakterienaufschwemmung ohne Zuhilfenahme einer das Verfahren komplizierenden Apparatur große Keimmengen in die Luft verstäubt, was sich bei pathogenen Arten von selbst verbietet und auch bei ganz harmlosen Typen in Anbetracht einer Verunreinigung der Laboratoriumsluft seine Bedenken haben könnte. Der zweite ist darin zu erblicken, daß die schwarzen Punkte auf der Platte regellos durcheinander liegen, so daß es oft schwierig fällt, in der Menge von unbrauchbaren Exemplaren die für Einzellkulturen geeigneten herauszufinden. Nicht selten macht man dann die unangenehme Erfahrung, daß ein allen Anforderungen entsprechender Punkt deshalb verworfen werden muß, weil er in zu großer Nähe von einem andern liegt, der mehrere Keime enthält und nach Entwickelung dieser zur Kolonie eine einwandfreie Abimpfung vereiteln könnte. Beide Uebelstände werden auf einmal beseitigt, wenn man die schwarzen Tröpfchen nicht mit dem Zerstäuber, sondern mit irgendeinem Instrument auf die Platte bringt. Man hat dabei noch den Vorteil, daß die Punkte in eine beliebige regelmäßige Anordnung gebracht werden können, was die allgemeine Uebersicht und das Wiederauffinden eines bestimmten Punktes sehr erleichtert.

Die auf die Gelatineplatte abzusetzenden Tuschetröpfchen konnten, wie leicht einzusehen, kaum zu klein, wohl aber zu groß ausfallen. Unter den Mitteln, welche geeignet sind, kleinste Tröpfchen bezw. Punkte zu erzeugen, wurden Glaskapillaren und spitze Zeichnungsfedern geprüft. Die letztern waren den erstern entschieden überlegen und boten außerdem den Vorteil, sich nach mechanischer Reinigung in der Flamme rasch sterilisieren zu lassen, um sofort wieder gebrauchsfertig zu sein. Wir wären somit wieder zur Feder zurückgekehrt, von der wir bei der „Tröpfchenkultur“ ausgegangen sind. Sie hat nun unsern Zwecken in anderer Weise zu dienen. Früher dazu bestimmt, Tröpfchen mit keim-

haltiger Nährlösung auf die Unterseite des Deckglases abzusetzen, verwenden wir sie jetzt, um kleinste Tröpfchen des nicht nährenden schwarzen Gemisches samt den darin aufgeschwemmten Keimen auf die Gelatineplatte zu bringen, auf welcher sie unter Umständen im eingetrockneten Zustand verbleiben, von welcher sie unter Umständen, wie wir sofort sehen werden, auch wieder entfernt werden, um die Entwicklung der Kolonien auf irgendeinem anderen Nährboden vor sich gehen zu lassen.

Es bleibt noch eine Eigenschaft der auf erstarrte Gelatine aufgebrachten Tuschetröpfchen oder vielmehr der als Eintrocknungsrückstand verbleibenden Tuscheplättchen zu erwähnen, die für das hier besprochene Verfahren der Einzellkultur von größter Tragweite ist. Ich meine die Eigenschaft dieser Plättchen, an dem aufgelegten Deckglase besser zu haften als an der Gelatine. So einleuchtend diese Tatsache ist, so wirkt sie bei erstmaliger Beobachtung in eigentümlicher Weise überraschend. Dabei arbeitet der Mechanismus, d. h. die Uebertragung des Tuscheplättchens von der Gelatine auf das Glas, mit einer geradezu staunenswerten Präzision. Wir bringen z. B. aus einer Bakterienaufschwemmung in verdünnter Tusche mit Hilfe der sterilisierten Zeichnungsfeder 6 Reihen zu 6 feinen Punkten von 0,1—0.2 mm Durchmesser auf die Gelatineplatte. Höchstens eine halbe Minute später bedecken wir die 36 Punkte mit einem reinen Deckglas und nehmen die mikroskopische Untersuchung bei schwacher und starker Vergrößerung vor. Wir merken uns einen bestimmten Punkt. Er möge 3 Stäbchen in der Gruppierung eines gleichschenkligen Dreiecks enthalten, daneben ein Fremdkörperchen, das nach seiner Form zu urteilen sicher kein Bakterium ist und endlich am Rande eine kleine Einkerbung. Nun heben wir das Deckglas mittels Pinzette sorgfältig von der Gelatine ab. Sämtliche 36 Punkte sind jetzt am Deckglas zu sehen, während die betreffende Stelle der Gelatineplatte vollständig unberührt erscheint. Legen wir nun das Deckglas mit den Punkten nach unten auf eine andere Stelle der Gelatineplatte, so wird uns eine erneute mikroskopische Untersuchung haarscharf dasselbe Bild wie früher liefern, im vorliegenden Fall z. B. in einem bestimmten Punkt die 3 Stäbchen in früher gesehener Lagerung, daneben das Femdkörperchen und endlich die Einkerbung am Rande der schwarzen Scheibe. Nichts geht beim Transporte verloren, nichts wird in der Struktur des Plättchens oder Scheibchens geändert. Diese hier geschilderte Transportfähigkeit der Tuscheplättchen ist aus dem Grunde so wichtig, weil sie uns im weitesten Sinne von der Art des Nährbodens und den übrigen von den einzelnen Mikroorganismen verlangten Entwickelungsbedingungen unabhängig macht. Ebenso, wie wir mit dem in einem Tuscheplättchen enthaltenen einzelnen Keim in angedeuteter Weise auf der Gelatineplatte den Ort wechseln wie mit einer Schachfigur, liegt es in unserer Hand, das Tuscheplättchen oder, was dasselbe ist, den einzelnen Keim auf eine Kartoffel oder in Bouillon oder auf ein aseptisch präpariertes Organstück zu legen. Mit anderen Worten: Wir benutzen die Gelatineplatte nur zur Feststellung des isolierten Keims; die Entwickelung zur Kolonie, d. i. zur eigentlichen Einzell*kultur* lassen wir unter Bedingungen vor sich gehen, wie wir sie im einzelnen Fall für geeignet halten.

Ich glaubte im Sinne des Lesers zu handeln, wenn ich die Vorversuche, aus welchen sich nach und nach die Bakterieneinzellkultur in ihrer gegenwärtigen Form entwickelte, verhältnismäßig ausführlich wieder-

gab. Die leitenden Gedanken traten so in wünschbarer Anschaulichkeit hervor und es wird auch unschwer sein, auf Grund der gemachten Mitteilungen das Verhältnis einzuschätzen, in welchem das vorliegende Verfahren zu andern, ähnliche Zwecke verfolgenden, steht.

4. Die jetzige Form des Verfahrens.

In diesem Abschnitt beabsichtige ich, eine eingehende Beschreibung des Verfahrens zu geben, die es jedem mit den Elementen der bakteriologischen Arbeitstechnik Vertrauten ermöglichen soll, unter geringstem Aufwand von Zeit und Mitteln seine Reinkulturen üblicher Art in zuverlässige Einzellkulturen überzuführen.

Wie aus dem oben Gesagten hervorging, haben wir auseinander zu halten die Isolierung des gewünschten Keimes einerseits und die Entwicklung des isolierten Keimes zur Kolonie anderseits. Der erste Teil des Verfahrens bleibt für alle möglichen Keimarten derselbe, während sich die Ausführung des zweiten Teils nach den besonderen Ansprüchen der einzelnen Arten zu richten hat. Von dem bei Ausführung unseres Einzellverfahrens maßgebenden praktischen Gesichtspunkt ausgehend, wollen wir die überhaupt kultivierbaren Bakterien in zwei große Gruppen teilen, je nachdem sie auf Gelatinenährböden, die selbstredend bei Zimmertemperatur (höchstens 22° C) gehalten werden müssen, gedeihen oder nicht. Bei den auf Gelatinenährböden bei Zimmertemperatur wachsenden Arten gestaltet sich naturgemäß die Herstellung der Einzellkultur außerordentlich einfach, denn wir brauchen das als Träger eines einzelnen Keimes erkannte Tuschescheibchen einfach auf der Gelatine liegen zu lassen und abzuwarten, bis die Vermehrung des Keimes so weit fortgeschritten ist, daß eine Abimpfung erfolgen kann. Dieser einfachere Fall soll zuerst behandelt werden.

a) Die Anwendung auf Bakterienarten, welche auf Gelatineplatten gedeihen.

Ich benutze hier folgende Ausrüstung:

Mikroskop mit geräumigem Objekttisch;

zwei auf Glasstäben befestigte, am Ende zu Oesen umgebogene Platindrähte, wovon der eine, stärkere, 4—5 mm und der andere, schwächere, 1 mm innere Oeffnung hat;

Zeichnungsfedern (auch Tuschefedern genannt) mit tadelloser Spitze, dazu ein passender Federhalter mit metallenem Vorderteil, welcher das Auswechseln der Federn gestattet;

einige gewöhnliche Objektträger und Deckgläser; Glasglocke zum Bedecken der in der Flamme sterilisierten und zur Abkühlung hingelegten Objektträger;

einige Deckglaszangen nach Cornet für die in der Flamme sterilisierten Deckgläser;

einige Petrischalen mit erstarrter steriler Gelatineschicht;

in Reagenzgläsern vorrätige, sterilisierte verdünnte Tusche.

Die Ausführung des Verfahrens selbst läßt sich in folgende Einzeloperationen zerlegen:

1. Vorbereitung der Gelatineplatten und der Tuscheverdünnung.

2. Sterilisieren eines Objektträgers, einiger Deckgläser, der Platindrähte und der Tuschefeder. Der Objektträger wird unter der Glasglocke, die Deckgläser in der Deckglaszange erkalten gelassen.

3. Mit Hilfe der großen Platinöse nacheinander 4 große Tuschetropfen aus dem Reagenzglas entnehmen und nebeneinander auf den Objektträger setzen.

4. Sofort eine geringe Menge des keimhaltigen Materials (aus Stich-, Strich- oder flüssigen Kulturen) in den ersten Tuschetropfen übertragen und darin zerreiben. Mittels der kleinen Oese etwas Tusche aus dem ersten Tropfen in den zweiten, aus dem zweiten in den dritten usw. übertragen.

5. Ohne Verzögerung mit der untern konkaven Seite der Feder Material aus den zwei letzten Verdünnungen (4. und 3. Tuschetropfen) entnehmen und auf die Gelatineplatte die Punkte in regelmäßigen Reihen auftragen.

6. Nach dem Reinigen der Feder Auflegen eines Deckglases auf die Punkte.

7. Mikroskopische Untersuchung und bei nicht zusagendem Befund Wiederholung des Verfahrens bei abgeänderten Verdünnungsverhältnissen.

8. Bei günstigem Ausfall Abimpfung der im Laufe der Zeit gewachsenen Einzellkolonien auf einen beliebigen sterilen Nährboden.

Zu diesem in möglichster Kürze gezeichneten Gang des Verfahrens möchte ich noch eine Reihe von erläuternden Zusätzen machen, welche Erfahrungen wiedergeben, die ich seit meiner ersten Veröffentlichung über den Gegenstand sammeln konnte. Es geschah dies sowohl gelegentlich von Versuchen, die geradezu im Interesse eines weitern Ausbaues der Tuschepunktkultur unternommen wurden, als auch bei Arbeiten, in denen das neue Verfahren schon praktische Anwendung fand und somit nur Mittel zum Zwecke war.

Zu 1. Als Gelatine verwende ich gewöhnliche 10-proz. Fleischwasser-Peptongelatine oder Molkengelatine. Selbstverständlich kann auch irgendeine andere Spezialgelatine, wie z. B. Bierwürzegelatine, dem Zwecke dienen. Es ist nicht nötig, daß die Platten unmittelbar vor dem Gebrauch gegossen worden sind; ich habe auch mit gutem Erfolg Platten im Alter von mehreren Tagen verwendet. Diese Maßnahme dürfte sich geradezu empfehlen, wenn der Schmelzpunkt der Gelatine ein verhältnismäßig niedriger ist.

Als Tuscheverdünnung benützte ich ursprünglich ein Gemisch von 1 Volum der überall käuflichen „flüssigen Perltusche" der Firma Günther Wagner (Hannover und Wien) mit 6—10 Volumen destillierten Wassers. Später bediente ich mich eines von der genannten Firma eigens für meine Zwecke hergestellten Präparates, das von nun an durch Dr. G. Grübler & Cie. in Leipzig bezogen werden kann. Es ist zweckmäßig, gleich den ganzen Inhalt eines Fläschchens oder Gläschens mit der entsprechenden Wassermenge (1 Teil konz. Tusche : 9 Teile dest. Wasser) gründlich zu mischen, die schwarze Flüssigkeit zu 10 ccm auf möglichst saubere Reagenzgläser abzufüllen und unter Watteverschluß im Autoklaven (1/2 Std. 1/2 Atm.) zu sterilisieren. Die frischbereitete Mischung zeichnet sich beim Gebrauch nicht selten und besonders dann, wenn zu ihrer Herstellung die gewöhnliche Tusche des Handels diente, durch störende Verunreinigungen, wie Partikelchen nicht definierbarer Art, Bakterienleichen u. dergl. aus, die jedoch durch Filtration nicht zu ent-

fernen sind. Auch das Zentrifugieren leistet nach unsern Erfahrungen nicht wesentlich bessere Dienste. Am einfachsten ist es, die Gläschen vor dem Gebrauch mindestens zwei Wochen stehen zu lassen, wobei ein Sedimentierungprozeß eintritt, dessen Wirkung sich darin äußert, daß nun mit Tusche aus den obern Schichten fast ausnahmslos homogene Scheibchen erzielt werden, die keine andern, als die vom Impfmaterial stammenden geformten Elemente enthalten. Um den Vorrat der Tuschegläschen vor zu starker Eindunstung zu bewahren, kann man sich nach Absengung des Wattestopfens und Glasrandes irgendeines der üblichen Verschlüsse bedienen.

Zu 2. Der Objektträger soll absolut rein und im besondern frei von Fett sein, weil sonst die später aufgebrachten großen Tuschetropfen in unregelmäßiger Form zerlaufen würden. Die Platinösen dürfen nach dem Ausglühen nicht mit Aschenrückständen behaftet sein; man tut gut, diese Instrumente vor dem Glühen schnell in reinem Wasser abzuspülen. Die Sterilisierung der Tuschefeder hat sehr schonend zu geschehen. Ein Glühen ist zu vermeiden, damit die feinen Spitzen nicht rauh werden. Ein nach dem Waschen und Abtrocknen mit einem feinen Tuch erfolgendes einmaliges rasches Durch-die-Flamme-Ziehen genügt bei der schnellen Wärmeaufnahme durch das Metall vollständig.

Zu 3. Das Gläschen mit der Tuscheverdünnung soll nicht geschüttelt werden. Bei schräger Stellung entnimmt man mittelst der großen Oese hintereinander die 4 Tropfen, indem man die Oese vollkommen untertaucht, jedoch ohne auf den Grund des Gläschens zu kommen. Ein Ausglühen zwischen den einzelnen Tropfenentnahmen hat selbstverständlich keinen Zweck und würde nur einen Zeitverlust bedeuten.

Zu 4. Um eine unerwünschte Konzentrationszunahme der Tuschetropfen zu verhindern, spült man die bei 3 benützte Oese nur schnell in Wasser und schreitet sofort zur Impfung des ersten Tropfens, die im allgemeinen mit einer gewöhnlichen geraden Platinnadel aus einer Stich- oder Strichkultur erfolgt. Die Uebertragung des keimhaltigen Materials in die folgenden Tropfen geschieht mit der bereit gehaltenen kleinen Oese, selbstverständlich ohne diese zwischen der Herstellung der verschiedenen Verdünnungen auszuglühen. Auf diese Weise erreicht man, daß die Bakterien mit der Tusche nur möglichst kurze Zeit in Berührung sind, ein Umstand, der von Bedeutung ist, indem die Tuschemischung, nach gewissen Erfahrungen zu schließen, nicht für alle Bakterienarten eine vollkommen indifferente Flüssigkeit zu sein scheint.

Was die Menge des in den ersten Tropfen überzuführenden Impfmaterials anbelangt, so lernt man durch Uebung das Richtige treffen. Bei Verwendung von Strichkulturen genügt im allgemeinen eine kaum sichtbare Spur an der Nadelspitze, während bei flüssigen Kulturen als Ausgangspunkt unter Umständen eine volle kleine Oese so wenig Keime liefert, daß die aus dem 3. und 4. Tropfen angelegten Punkte gänzlich keimfrei und daher nicht zu gebrauchen sind.

Zu 5. Man berührt den Tropfen, aus welchem Material entnommen werden soll, mit der fast horizontal gehaltenen Feder und erzeugt die Punkte auf der Gelatine, indem man bei aufgestützter Hand schnell, aber vorsichtig, eine stechende Bewegung nach der Gelatinefläche ausführt. Die Gelatine darf hierbei jedoch nicht „verwundet“ werden; die Berührung muß so fein sein, daß sie eigentlich nur durch die zwischen den beiden Federspitzen etwas vorstehende Flüssigkeitskuppe erfolgt. Um möglichst kleine Punkte zu erzeugen, wird man im allgemeinen zweck-

mäßig Federn mit möglichst feiner Spitze verwenden. Doch soll damit nicht gesagt sein, daß eine Feder mit verhältnismäßig stumpfer Spitze für unser Zwecke unbrauchbar sei. Ich habe im Gegenteil den Eindruck gewonnen, daß zur Erzielung möglichst dünner, wenn auch nicht außerordentlich kleiner Tuschepunkte die stumpfen Federn den spitzen überlegen sind. Es mag dies daher rühren, daß die Flüssigkeitskuppe bei den ersteren einen größeren Radius hat als bei den letzteren und somit beim Absetzen des Tröpfchens auf die Gelatine ein gewisses Quantum Tusche im ersten Falle sofort auf eine Fläche von bedeutendem Umfang gelangt, während sich im zweiten Fall die Berührungszone sozusagen auf einen Punkt reduziert, von dem aus nun die Ausbreitung der Teilchen zu erfolgen hat. Es empfiehlt sich, die Punkte in gleichmäßigen Reihen aufzutragen, wobei die Gesamtzahl sich nach der zu isolierenden Keimart zu richten hat. Bei nicht verflüssigenden Arten, wie z. B. den Coli-Rassen, kann man sehr wohl 6×6 Punkte in Form eines Quadrates gruppieren, während bei verflüssigenden Arten, z. B. bei Kartoffelbazillen, auf den gleichen Flächenraum besser nur 3×3 Punkte verteilt werden. Die Keime der letzteren Art haben nämlich im Gegensatz zu den vorigen die Eigentümlichkeit, zu Kolonien von fädigem Charakter auszuwachsen. Diese Fäden greifen nach allen Seiten weit aus, und es liegt die Gefahr nahe, daß die Vorposten nach kurzer Zeit in das Gebiet eines benachbarten Punktes übergreifen und so den beabsichtigten Zweck der Kultur aus einer Zelle vereiteln.

Zu 6. Obwohl sich gewöhnlich schon bei schwacher mikroskopischer Vergrößerung, welche die Verwendung eines Deckglases im allgemeinen nicht erfordert, ein zuverlässiges Urteil über den Ausfall der Punkte, speziell über die Eignung der angewendeten Verdünnung, gewinnen läßt, so empfiehlt es sich doch, gleich nach der Reinigung der Feder, also nach etwa einer halben Minute, ein Deckglas auf die Punkte zu legen. Wartet man länger, so muß man darauf gefaßt sein, jeden der Punkte nach dem Bedecken mit dem Deckglas bei mikroskopischer Betrachtung durch eine zwischen Glas und Tuschescheibchen befindliche Luftblase entstellt zu sehen. Es scheint, daß nach dem Eintrocknen der Tröpfchen, das in wenigen Sekunden erfolgt, sich Spannungszustände geltend machen, die eine schwache Konkavität des Scheibchens bedingen, welche genügt, um beim Auflegen des Glases eine Luftblase zu fangen. Hat man es versäumt, das Deckglas rechtzeitig aufzulegen und ist der mikroskopische Befund im übrigen günstig ausgefallen, so kann man bei sorgfältiger Senkung des Tubus und unter Voraussetzung guter Zentrierung der Objektive eine Kontrolle des Befundes mit starkem Trockensystem versuchen und die Platte mit dem gewöhnlichen Deckel bedeckt bis zur Entwickelung der Kolonie zur Seite stellen. Die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung mit Luftkeimen ist bei solchem Vorgehen außerordentlich gering; sollte sich trotzdem eine solche eingestellt haben, so wäre sie bei einer nachträglichen Prüfung der Kultur leicht zu erkennen.

Zu 7. Die Art und Weise der Herstellung der Tuschepunkte erlaubt ihre Untersuchung bei beliebig starken Vergrößerungen, selbst mit Immersionssystemen. Doch reicht im allgemeinen die Verwendung eines schwächeren und eines stärkeren Trockensystems vollständig aus. Auch bei kleineren Organismen wird man dabei selten im Zweifel darüber sein, ob ein bestimmtes Partikel als Bakterium aufzufassen ist oder nicht. Selbstverständlich wird man Tuschetröpfchen, in denen neben

einer deutlichen Bakterienzelle noch zweifelhafte Elemente zu sehen sind, in der Regel überhaupt nicht berücksichtigen oder dann mittels des Immersionssystems genauer prüfen. Hat man die Punkte in regelmäßigen Reihen angeordnet, so ist es außerordentlich leicht, sich diejenigen, die nur eine Zelle enthalten, zu merken. Man braucht nur die Reihe und die Stellung des betreffenden Punktes innerhalb der Reihe zu notieren. Von einer direkten Markierung durch Anbringung eines Farben- oder Tinteuringes um die Punkte oder auf ähnliche Weise ist abzuraten, weil dabei leicht ein so starker Druck auf das Deckglas ausgeübt werden könnte, daß die Struktur des Tuschescheibchens, das wir immerhin als verhältnismäßig weiches Gebilde zu betrachten haben, eine Störung erleiden würde. Hingegen ist es ganz zweckmäßig, die Tuschepunkte, welche nur eine Zelle enthalten, an der Unterseite der Nährbodenschale mittels gewöhnlicher Tinte zu kennzeichnen. Diese Maßnahme bildet besonders dann eine willkommene Ergänzung zu den die Punkte betreffenden Notizen, wenn die Verdünnung so weitgehend war, daß verschiedene Punkte überhaupt steril bleiben, so daß die aufgehenden Kolonien mehr oder weniger lückenhafte Reihen bilden. Man könnte sich nun mit der Notierung begnügen und abwarten, bis die Vermehrung so weit fortgeschritten ist, daß die Kolonie von bloßem Auge sichtbar wird und abgeimpft werden kann. Zum Ueberfluß steht uns aber eine weitere Möglichkeit der Kontrolle zur Verfügung, indem es in unserer Hand liegt, das Verhalten der auf den Nährboden gesetzten Zelle im vollsten Sinne des Wortes Schritt für Schritt zu verfolgen. Wenn also noch irgendein Zweifel bestanden hätte, ob ein gewisses Element im Tuschescheibchen ein kleiner Organismus sei oder vielleicht bloß ein nicht organisiertes Partikel, so wird uns die mikroskopische Ueberwachung des Scheibchens endgültigen Aufschluß geben. Indem wir sehen, daß das fragliche Partikel nicht auskeimt, wird unsere Vermutung, daß es sich um kein Bakterium handelt, zunächst mit ziemlicher Sicherheit bestätigt. Wir sind aber sogar in der Lage, die Ursache des Zweifels selbst zu entfernen und so bezüglich unserer Reinkultur den denkbar höchsten Grad von Sicherheit zu erlangen. Zu diesem Zweck brauchen wir bloß das Deckglas zu entfernen, nachdem die Kolonie bis zu einer gewissen Zellenzahl gediehen ist. Die Tuschepunkte werden, wie früher angegeben, am Deckglas haften und, an anderer Stelle der Platte oder als Präparat auf einem Objektträger montiert, genau das mikroskopische Bild wie am Anfang zeigen. Nur da, wo früher die einzelne Zelle lag, findet sich jetzt eine ganze Gruppe von solchen, während das fragliche Partikel noch unverändert an seinem Platze liegt. Mit dem Deckglas haben wir aber nicht die ganze Kolonie disloziert, sondern ein großer Teil der neugebildeten Zellen ist im Nährboden haften geblieben, und nach Verlauf einer gewissen Zeit sehen wir dort eine Kolonie sichtbar werden, die als unzweifelhafte Einzellkultur abgeimpft werden kann.

Zu 8. Zum Abimpfen wäre nur die Bemerkung zu machen, daß es sich bei luftliebenden Bakterien überhaupt nicht empfiehlt, das Deckglas so lange auf der Gelatineplatte zu lassen, bis die Kolonien eine ansehnliche Größe erreicht haben. Sobald man sich vom Auswachsen der in einem Tuschescheibchen liegenden einzelnen Zelle zur jungen Kolonie von 50—100 Zellen überzeugt hat, kann man das Deckglas entfernen und man wird die Beobachtung machen, daß unter der Einwirkung des frei zutretenden Sauerstoffs ein Impuls zu vermehrter

vegetativer Tätigkeit sich der jungen Kolonie bemächtigt, so daß sie um so früher abgeimpft werden kann und den weiteren Vorteil bietet, nicht so sehr in die Fläche zu wachsen, wie dies unter dem Druck des Deckglases naturgemäß der Fall sein muß.

b) Die Anwendung auf Bakterienarten, welche auf Gelatineplatten nicht gedeihen.

Während die vorige Bakteriengruppe weitaus die Mehrzahl der praktisch wichtigen Arten umfaßt, gehören in die uns hier beschäftigende vor allem die obligaten Anaërobien und unter den fakultativen Anaërobien jene mit vorwiegender Tendenz zu anaërober Lebensweise; ferner die an höhere Temperaturen angepaßten Formen, sodann gewisse an die Zusammensetzung des Nährbodens hohe Anforderungen stellende Vertreter aus der Gruppe der Pathogenen, die nur in flüssigen Medien ihr Fortkommen findenden Arten u. a. m.

Während kein Grund vorliegt, bei der Isolierung der Keime hier anders zu verfahren als bei der vorigen Gruppe, verlangt die Entwicklung des Keimes eine Berücksichtigung der besonderen Ansprüche bezüglich der Entwicklungsbedingungen, wobei Sauerstoffabwesenheit und höhere Temperatur offenbar die erste Rolle spielen. Wenn man einmal so weit ist, daß der gewünschte Keim klar erkennbar als einzig lebendes Wesen im Tuschescheibchen auf der Gelatineplatte liegt, dann stehen verschiedene Wege offen, um ihn in andere Verhältnisse zu versetzen. Alle fußen auf der weiter oben geschilderten Transportfähigkeit des Keimes, die es uns z. B. erlaubt, das Deckglas von der Gelatineplatte abzuheben und auf eine Agarplatte zu übertragen, um den Keim selbst mit untrüglicher Sicherheit ebenfalls auf der Agarplatte zu sehen. Er kann sich jetzt bei Brut- und noch höherer Temperatur in kurzer Zeit entwickeln, während er auf der Gelatineplatte wegen ungünstiger Beschaffenheit des Temperaturfaktors verkümmert oder wenigstens zur Untätigkeit verurteilt wäre. Aehnlich könnte man, um anaërobe Verhältnisse zu schaffen, z. B. nach Entfernung des Deckglases auf den nur eine Zelle enthaltenden Tuschepunkt ein Tröpfchen einer passenden Nährlösung geben und hierauf das Deckglas mit dem Tröpfchen nach unten auf einen Objektträger mit entsprechendem Hohlraum, der sauerstofffrei gemacht werden kann, aufkitten. Nach eingetretenem Wachstum wäre es dann ein leichtes, Material aus dem Tröpfchen zu entnehmen und auf beliebige, anaërobe Bedingungen bietende Nährböden zu übertragen. Ich habe diesen Weg nicht eingeschlagen, weil er nicht genügend einfach ist und weil mir in ihm für die Entwicklung der Anaëroben im allgemeinen nicht optimale Bedingungen verwirklicht zu sein schienen.

Nach meiner festen Ueberzeugung, der ich gelegentlich der Publikation meiner[1]) auf Liborius' Kultur in hoher Schicht fußenden Anaëroben-Isolierungsmethode Ausdruck gegeben habe, und für welche auch mein Schüler und Mitarbeiter J. Kürsteiner[2]) in seinen Beiträgen zur Untersuchungstechnik der Anaëroben Belege erbrachte, finden luftscheue Bakterien die zusagendsten Verhältnisse in festen Nährböden in hoher Schicht. Mein Bestreben war also darauf gerichtet, die betreffende

---

1) Burri, R., Centralbl. f. Bakt., 2. Abt., Bd. VIII, 1902, p. 533.
2) Kürsteiner, J., daselbst, Bd. XIX, 1907, p. 101.

Erkenntnis bei der Anaëroben-Einzellkultur zu verwerten. Gleichzeitig schwebte mir das Ziel vor, für alle Bakterien der zweiten Gruppe, d. h. für diejenigen, deren Keime sich auf Gelatineplatten bei Zimmertemperatur nicht zu Kolonien entwickeln, das Verfahren möglichst einheitlich zu gestalten. Der hierfür eingeschlagene Weg ist der folgende.

Die Vornahme der verschiedenen Verdünnungen des Keimmaterials im Tuschegemisch erfolgt genau wie bei der ersten Gruppe. Sind die 4 Tuschetropfen geimpft, so macht man mit der Feder auf eine besondere Gelatineplatte einige Probepunkte, um zu sehen, ob die Verdünnung eine günstige ist. Diese Frage wird in den meisten Fällen mit Hilfe einer schwachen Vergrößerung und ohne die Probepunkte mit einem Deckglas zu bedecken, in kürzester Zeit zu beantworten sein. Ist der Befund den Erwartungen nicht entsprechend, so wird die Verdünnungsarbeit wiederholt. Bei gewünschtem Ergebnis geht man sofort zur endgültigen Herstellung der Tuschepunkte über. Diese werden nun nicht, wie früher angegeben, in Reihen auf einer Fläche von weniger als Deckglasgröße zusammengestellt, sondern in verhältnismäßig weiten Abständen, immerhin auch in möglichst regelmäßiger Anordnung auf die ganze Gelatineplatte verteilt. Auf jeden der Punkte legt man ein steriles Deckglassplitterchen von etwa 4 qmm Fläche, das hier die Stelle des Deckglases vertritt. Solche Deckglasfragmente von einigermaßen regelmäßiger Form sind leicht mit Hilfe eines Diamantstiftes aus gereinigten Deckgläsern zu schneiden und können nachher, z. B. zu 20 Stück abgezählt, in kleinen Röhrchen von ca. 5 mm Durchmesser sterilisiert und so vorrätig gehalten werden. Ich habe es für praktisch befunden, die Sterilisation in kleinen reagenzglasähnlichen Röhrchen, die an Stelle der Watte eine Verschlußkappe aus Glas hatten, im Heißluftschrank vorzunehmen. Es wurde so vermieden, daß die kleinen Glasstücke durch von der Watte stammende Produkte der trockenen Destillation Trübungen erlitten. Nach dem Aufbringen der Deckglassplitter, bei welcher Arbeit das Einschließen von Luftblasen viel weniger zu befürchten ist als beim Auflegen ganzer Deckgläser, kommt die mikroskopische Prüfung an die Reihe. Man muß sich hier mit Trockensystemen begnügen, die jedoch in den allermeisten Fällen ausreichen dürften, indem es sich bei den Vertretern der zweiten Gruppe vorwiegend um Sporenbildner, d. h. um mittelgroße bis große Stäbchen handelt.

Hat man Tuschepunkte mit nur einer Zelle ausfindig gemacht, so kann es sich nur noch darum handeln, die einzelnen Zellen in die für die Auskeimung günstigen Verhältnisse zu versetzen. Bestehen die letzteren z. B. in einem Minimum des Sauerstoffdruckes, so wirft man das mit steriler Pinzette von der Gelatineschicht abgehobene Glassplitterchen in einen Reagierzylinder, der z. B. den verflüssigten und auf 42° C abgekühlten Agar enthält, und sorgt dafür, daß es sofort untersinkt. Der Tuschepunkt und der Keim wird bei dem folgenden Erstarren des Agars in der Tiefe fixiert und kann sich dort unter den günstigsten Bedingungen zur Einzellkultur entwickeln. Auf diese Weise habe ich den obligat anaëroben B a c i l l u s p u t r i f i c u s Bienstock in absoluter Reinkultur gewonnen. Kommt es weniger auf weitgehenden Sauerstoffentzug an, wie bei vielen luftscheuen, aber doch nicht obligat anaëroben Milchsäurebakterien, so kann man das Glassplitterchen mit der isolierten Zelle ohne weiteres in eine passende Nährlösung werfen. In dieser Weise verfahren wir z. B. in unserem Laboratorium, um Einzellkulturen der Milchsäurebakterien (B a c. c a s e i ε v. Freudenr.) zu gewinnen,

welche einen Bestandteil der an die Praxis abzugebenden Reinkulturen zur Bereitung einer günstig beschaffenen Lablösung für die Emmenthalerkäserei bilden.

Durch den skizzierten Kunstgriff, den isolierten Keim mittelst eines sterilen Tuscheplättchens an ein sterilisiertes Glassplitterchen zu heften, sind, wie leicht einzusehen ist, alle nur denkbaren Kulturmethoden und Kombinationen von Entwicklungsbedingungen dem Prinzip der Einzellkultur zugänglich gemacht. Es ist sogar denkbar, daß auf dem angedeuteten Wege Arten in Reinkultur gewonnen werden können, die bisher nicht kultivierbar waren, z. B. gewisse Spirillen, die man nach vorausgegangener Anreicherung mit Umgehung fester Medien isolieren würde.

Ein Einwand könnte allerdings erhoben werden und soll hier bezüglich seiner Berechtigung erörtert werden, nämlich die Möglichkeit einer Verunreinigung mit sogenannten Luftkeimen. Wenn auch zugegeben werden muß, daß die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung der Tuschepunkte selbst während ihrer Herstellung bei der außerordentlich geringen von ihnen eingenommenen Fläche sozusagen gleich null ist, so könnten doch während der mikroskopischen Durchmusterung der Glassplitter Luftbakterien auf die letzteren fallen und mit in die zur Entwicklung des einzelnen Keims bestimmten Nährmedien übertragen werden. Aber auch diese Wahrscheinlichkeit ist sehr gering, wie folgende Ueberlegung zeigt. Die Oberfläche der Gelatine in einer gewöhnlichen Petrischale beträgt durchschnittlich 63 qcm = 6300 qmm. Die je einen der 20 Tuschepunkte bedeckenden Glassplitterchen von etwa 5 qmm messen zusammen 100 qmm, nehmen also den 63. Teil der ganzen Fläche ein; mit andern Worten: es müssen also schon über 60 Luftkeime auf die Platte fallen, damit es der Wahrscheinlichkeit nach einen einzigen auf die Gesamtfläche der Glassplitter trifft. Für das einzelne Splitterchen ist aber die Wahrscheinlichkeit noch 20 mal geringer, bezw. jene Zahl 60 erhöht sich dann auf 1200. Ein Versuch, den ich ausführte, ist ganz in diesem Sinne ausgefallen. Fünf Petrischalen mit erstarrter Gelatine wurden mit je 20 keimfreien Tuschepunkten besetzt und sämtliche Punkte mit Glassplittern von durchschnittlich mindestens 5 qmm Größe bedeckt. Die eine Schale wurde sofort mit dem Deckel geschlossen, die zweite nach 1 Minute, die dritte nach 5, die vierte nach 10 und die fünfte nach 15 Minuten. Nun wurden die Splitter von allen fünf Schalen mittelst sterilisierter Pinzette aufgenommen und einzeln in Reagenzgläser, die 10 ccm Nährbouillon enthielten, geworfen. Die 100 Bouillongläschen wurden zuerst einige Tage im Wärmeschrank bei 30° und dann noch 10 Tage im Zimmer bei 18—20° aufbewahrt. Sämtliche sind klar geblieben. Selbstverständlich machten die längere Zeit, im besondern die 10 und 15 Minuten der Luft ausgesetzten Gelatineplatten nachträglich einen stark verunreinigten Eindruck, doch erreichte die Kolonienzahl, die wegen eingetretener Verflüssigung nur geschätzt werden konnte, sicherlich nicht 60 und überdies wird die mikroskopische Durchmusterung von 20 Tuschepunkten niemals 15 Minuten beanspruchen, sondern im allgemeinen in wenigen Minuten erledigt sein. Hiernach darf man über die Gefahr einer Verunreinigung vollkommen beruhigt sein, um so mehr, da eine solche eintretenden Falls nur auf Keime zurückzuführen wäre, die sich voraussichtlich leicht von den zur Aussaat gelangten unterscheiden lassen würden.

5. Die wissenschaftlichen Grundlagen.

Bei der im vorigen Abschnitt gegebenen Anleitung zur Herstellung von Bakterien-Einzellkulturen habe ich mich im wesentlichen auf Angaben beschränkt, welche unmittelbar den zu erreichenden Zweck betrafen. Es drängen sich nun bei der praktischen Ausübung des Verfahrens eine Reihe von Fragen auf, welche die eigentlichen Grundlagen der hier sich abspielenden Vorgänge berühren und deren Abklärung zu einem weiteren Ausbau bezw. zu einer Vervollkommnung der Methode unerläßlich ist. Weit entfernt davon, diese Fragen alle gelöst zu haben, möchte ich doch nicht unterlassen, die wichtigsten unter ihnen wenigstens den Umrissen nach kurz zu behandeln.

a) Umschreibung des Prinzips.

Schon bei der Besprechung der grundlegenden Vorversuche habe ich Gelegenheit gehabt, darauf hinzuweisen, daß es für gewisse Zwecke nützlich sei, die Isolierung eines Mikroorganismus und die Entwicklung des isolierten Organismus zur eigentlichen Kultur möglichst auseinander zu halten. Ein entsprechender Hinweis schien um so eher angebracht, als man nach einem eingebürgerten Sprachgebrauch in der Mikrobiologie unter Isolierung eines Organismus nicht bloß die Trennung von seiner Umgebung und besonders von Organismen anderer Art versteht, sondern gleichzeitig auch seine Züchtung auf einem zusagenden keimfreien Nährmedium einbegreift. Im Sinne der strengeren Fassung des Begriffes charakterisiert sich das Tuschepunktverfahren als ein reines Isolierungsverfahren, das zunächst mit dem Wachstum und der Vermehrung der Zelle nichts zu tun hat. Wir sind imstande, mit Hilfe dieses Verfahrens geradeso irgendwelche nicht organisierte kleinste Partikel, z. B. die Teilchen eines mineralischen Pulvers oder kleinste Stärkekörnchen zu isolieren, wie wir eine lebende Bakterienzelle isolieren. Es kann uns auch begegnen, daß wir, ohne es zu wissen, an Stelle einer lebenden eine tote Zelle von ihrer Umgebung trennen. Das bei der Isolierung der Keime wirksame Prinzip liegt der Hauptsache nach wie bei allen rationellen Isolierungsverfahren in der passenden Verdünnung des Keimmaterials in einer Flüssigkeit. Ist diese Flüssigkeit ein Nährmedium, und gelingt es, die Verdünnung so einzurichten, daß in einem abgetrennten Teil der Flüssigkeit, betrage er nun ein größeres Quantum oder bloß ein Tröpfchen, nur ein Keim enthalten ist, so ist die gewünschte Reinkultur vorhanden, falls die Entwicklungsbedingungen im übrigen günstige sind. Darin liegt das Prinzip aller bisherigen Reinkulturbestrebungen, der älteren wie der neueren, daß sie Isolierung im engeren Sinn und Kultivierung miteinander verbinden, indem sie das keimhaltige Material in einem Nährmedium verdünnen, das zugleich die Bestimmung hat, dem isolierten Keim als Entwicklungsunterlage zu dienen. In dieser engen Verbindung von Keimtrennung und Keimentwicklung dürfte aber auch das Hindernis zu suchen sein, das sich bisher einer Vervollkommnung der Reinzuchtverfahren, speziell auf dem Gebiet der Bakteriologie, entgegengestellt hat.

Bei der Tuschepunktkultur wird im Gegensatz zu allen bisherigen Verfahren das Hauptgewicht auf die Isolierung des Keims ohne Rücksicht auf dessen nachherige Entwicklung gelegt und dank diesem Umstande ist es möglich, die betreffende Operation mit großer Präzision

auszuführen. Gerade weil wir uns fürs erste um das Auswachsen des zu isolierenden Keimes gar nicht kümmern, sind wir in der Lage, alle Mittel zu benützen, welche der einwandfreien Isolierung dienen können. Dazu gehört in unserem Falle die Verwendung einer nicht nährenden, aber in anderer Beziehung bedeutende Vorteile bietenden Verdünnungsflüssigkeit, sowie der Verzicht auf die Beibehaltung des abgetrennten Tröpfchens, das wir einfach eintrocknen lassen und so in ein festes Gebilde verwandeln, ein annähernd kreisrundes Plättchen oder Scheibchen von außerordentlich geringer Dicke, in welchem sich die vorhandene Bakterienzelle mit überraschender Schärfe erkennen läßt. Ist man aber nicht an das Tröpfchen bezw. an dessen flüssige Konsistenz gebunden und hat man den isolierten Keim, wie dies bei unserem Verfahren möglich ist, mittelst des Tuscheplättchens an ein Deckglas oder an einen Glassplitter geheftet, so bedeutet das die größtmöglichste Bewegungsfreiheit für den Versuchsansteller. Er kann das überaus subtile Wesen gewissermaßen mit der Zange fassen und es absetzen, wohin es ihm beliebt. Die weitere Entwicklung des Keimes ist eine Frage für sich und hat mit seiner Isolierung nichts zu tun.

Mit diesen Erörterungen ist auch die Rolle gekennzeichnet, welche die Gelatine im Tuschepunktverfahren spielt. Es sind nicht dieselben Eigenschaften, welche die Gelatine für das Kochsche Plattenverfahren einerseits und für die Tuschepunktkultur andererseits so wertvoll machen. Was uns R. Koch schenkte, war das Prinzip des durchsichtigen, festen aber schmelzbaren Nährbodens, eine geniale Vereinigung von Isolierungs- und Kultivierungsmittel. Das wesentliche Hilfsmittel beim Tuschepunktverfahren ist nicht die Nährgelatine, sondern die Gelatine an sich. Nicht die chemischen und physikalischen, sondern nur die physikalischen Eigenschaften und speziell die Oberflächenbeschaffenheit spielt hier eine Rolle. Eine 10-proz. Gelatinelösung ohne alle Zusätze leistet uns für die Isolierung der Bakterien dieselben Dienste wie die Fleischwasserpeptongelatine, doch ist es bequem und naheliegend, sich für gelatinewüchsige Organismen gleich der letzteren zu bedienen, weil man so den isolierten Keim ohne weiteres liegen und auswachsen lassen kann und auch für jene Fälle, in welchen ein Transport des isolierten Keims auf einen anderen Nährboden notwendig ist, wird man der Bequemlichkeit halber die im Laboratorium gewöhnlich vorrätige Nährgelatine zur Isolierung verwenden.

Kurz zusammenfassend können wir das Prinzip der Tuschepunkt-Einzellkultur wie folgt umschreiben. Das Verfahren ist ein reines Isolierungs-, kein Züchtungsverfahren. Als Verdünnungsmittel des Keimmaterials dient sterilisierte flüssige Tusche. Die Keime werden dadurch in bestimmter Lage fixiert, daß man mit Hilfe einer Zeichnungsfeder möglichst kleine Tröpfchen des schwarzen Gemisches auf die Oberfläche einer erstarrten Schicht von Nährgelatine bringt, wo sie nach wenigen Sekunden verdunsten. In den Verdunstungsrückständen, außerordentlich dünnen, dunkelfarbigen Scheibchen, sind die Keime eingelagert. Sie treten als glashelle Elemente äußerst scharf hervor und können nach Auflegen eines Deckglases der Untersuchung mit beliebigen Vergrößerungen unterworfen werden. Mit der Auffindung von Tuschescheibchen, die eine einzige Zelle enthalten, ist der Zweck des Verfahrens erreicht. Für die Entwicklung des isolierten Keims zur Kolonie kommen wesentlich zwei Wege in Betracht. Bei gelatinewüchsigen Arten läßt man die Auskeimung an Ort und Stelle, d. h. auf der zur Isolierung benutzten Ge-

latineplatte erfolgen. Bei allen anderen Arten wird von vornherein jeder einzelne Punkt mit einem Deckglassplitter bedeckt. Sofort nach der mikroskopischen Prüfung werden die Splitter, welche Punkte mit nur einer Zelle bedecken, mittels Pinzette von der Gelatinefläche abgehoben. Die Tuschescheibchen mitsamt den eingeschlossenen Keimen bleiben dabei am Glase haften und können in beliebige Verhältnisse übertragen werden.

b) Die Eigenschaften der Tusche.

Die Möglichkeit, auf dem geschilderten Wege verhältnismäßig rasch und sicher in den Besitz von Bakterien-Einzellkulturen zu gelangen, ist aufs engste mit gewissen Eigenschaften der Tusche verbunden. Nun ist die Tusche des Handels, die feste wie die flüssige, nicht von jener einheitlichen Beschaffenheit, wie man sie bei einem Präparat, das wissenschaftlichen Zwecken dienen soll, vorauszusetzen gewohnt ist. Bekanntlich ist der Hauptbestandteil der schwarzen, sog. chinesischen Tusche ein sehr feiner Ruß, der durch unvollständige Verbrennung von öl- und harzreichen Pflanzenbestandteilen gewonnen und mit einer als Bindemittel wirkenden Flüssigkeit, meist mit einer Leimlösung, innig gemischt wird. Der Fabrikationsart steht begreiflicherweise ein weiter Spielraum offen, und wenn ich in erster Linie das flüssige Präparat der Firma Günther Wagner empfahl, so geschah es 1) weil ich damit gute Erfahrungen gemacht habe, 2) weil es weit verbreitet und wohl überall erhältlich ist und 3) weil die Beliebtheit des Präparates eine sehr umfangreiche Fabrikation bedingt und somit wohl auch eine gewisse Gleichmäßigkeit der Eigenschaften erwarten läßt. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß auch mit Tuschepräparaten anderer Herkunft zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden können. Die Hauptsache erscheint mir darin zu liegen, daß das Präparat seiner Natur nach dem Begriff der schwarzen Tusche entspricht und nicht eines jener Surrogate darstellt, die schwarze, zum Teil lösliche Farbstoffe enthalten und mit eigentlicher Tusche nur eine äußere Aehnlichkeit haben.

Die Eigenschaften der Tusche, welche für die Zwecke der Einzellkultur besonders in Betracht fallen, liegen auf dem Grenzgebiete von Physik und Chemie. Die flüssige Tusche ist ein Gemenge, bestehend aus äußerst kleinen Kohlenteilchen und andern beim Verbrennen des Rohmaterials in den Ruß übergehenden Teilchen, welche in einer Leimlösung, also in einer Flüssigkeit von ausgesprochen kolloidalem Charakter, in feinster Suspension enthalten sind. Die Kohlenteilchen sind so fein und schließen so vollkommen aneinander, daß man bei mikroskopischer Betrachtung eines eingetrockneten Tuschetröpfchens, selbst unter Verwendung des Immersionssystems, den Eindruck gewinnt, als ob es sich um den Rückstand einer bloßen kolloidalen Lösung handle. Dieses vollständige Zusammenschließen der Kohlenpartikel dürfte übrigens für die Annahme, daß jedes einzelne mit einer besonderen Leimhülle versehen ist, eine Stütze bilden. Genauer betrachtet, haben wir es bei der Tusche mit einem Gemenge von mindestens zwei dispersen Gebilden zu tun. Einmal haben wir die Aufschwemmung der Rußteilchen in Wasser, also die disperse Phase in Form eines festen Körpers im flüssigen Dispersionsmittel zerteilt (nach W. Ostwalds Definition ein Schlamm). Sodann haben wir die kolloidale Leimlösung, ihrem Charakter nach zwischen Emulsion und echter Lösung stehend. Die Leimlösung spielt gegenüber

der Rußteilchenaufschwemmung die Rolle eines Schutzkolloids, d. h. sie begünstigt die gleichmäßige und vollkommene Zerteilung dieser Teilchen in der Tusche. Alle Umstände, welche die feinere Struktur der Leimlösung stören, wie z. B. ihre Vermischung mit stark salzigen oder sauren Bakterienaufschwemmungen, haben das Ansflocken bezw. das Zusammentreten der Rußteilchen zu größeren Konglomeraten zur Folge.

In der Zeichen- und Maltechnik benutzt man die Tusche gewöhnlich als schwarze Farbe; aber für die Verwendbarkeit zur Bakterien-Einzellkultur liegt ihre Bedeutung gerade in der Eigenschaft, die Bakterien nicht zu färben. Mit dieser Eigenschaft aufs engste verknüpft ist die geradezu blendende Schärfe, mit welcher sich die Bakterien in dem auf der Gelatineplatte liegenden Tuschescheibchen von der hell- oder dunkelbraunen Umgebung abheben. Daß die Tusche nicht in gleichem Sinne auf die Bakterien färbend wirken kann, wie etwa eine Fuchsinlösung, ist selbstverständlich, denn der Ruß ist als absolut unlöslicher Farbstoff aufzufassen. Nicht ohne weiteres selbstverständlich erscheint aber die Tatsache, daß auch nicht die geringste oberflächliche Auf- oder Anlagerung von Tuscheteilchen an die Bakterienmembran erfolgt. Es sieht geradezu so aus, als ob die letztere ganz im besonderen befähigt sei, irgendwelche verunreinigende Fremdkörperchen von sich fern zu halten. Man wird kaum fehlgehen, wenn man diese Eigentümlichkeit mit der besonderen kolloidalen Beschaffenheit der Bakterienmembran in Zusammenhang bringt, welche einem Niederschlagen oder Ausflocken der suspendierten Kohlenteilchen direkt entgegenwirkt. Der praktische Erfolg eines solchen Verhaltens äußert sich, wie schon angedeutet, in der scharfen Kontrastwirkung, welche infolge des absoluten Ungefärbtbleibens des Mikroorganismus und der starken Dunkelfärbung seiner Umgebung erfolgt. Der Effekt auf das Auge ist im umgekehrten Sinne derselbe wie beim einfach gefärbten Ausstrichpräparat einer Bakterienreinkultur. Bei dieser haben wir infolge der Farbstoffspeicherung eine homogen gefärbte Bakterienzelle, die aus der vom Farbstoff befreiten Umgebung, z. B. dem als Einbettungsmittel dienenden Canadabalsam, auffallend hervorleuchtet. Zwei prinzipielle Unterschiede ergeben sich aber sofort bei einem weiteren Vergleich der beiden Fälle.

Während wir beim gewöhnlichen Färbungspräparat in weiten Grenzen unabhängig von der Schichtdicke des Einbettungsmittels sind, indem wir die gefärbte Zelle durch das farblose Einbettungsmedium hindurch sehen können, ist es natürlich nicht möglich, die ungefärbte Bakterienzelle durch eine Tuscheschicht von einigermaßen beträchtlicher, etwa 1 μ überschreitender Dicke zu erkennen, und es können demnach im allgemeinen für eine einwandfreie Untersuchung von in trockener Tusche liegenden Bakterien nur Schichten in Betracht fallen, die dünner sind als die Querdurchmesser der gewöhnlichen Bakterien, d. h. Schichten von etwa $^1/_2$ μ Höhe. Diese Verhältnisse sind nun in der Tuschepunktkultur, wie später ausführlicher bewiesen werden soll, verwirklicht. Das Präparat im Tuschepunkt ist nicht zu vergleichen einem Präparat, bei welchem die Mikroorganismen allseitig von einem der üblichen Einbettungsmittel eingeschlossen sind; es erinnert mehr an eine Mosaik, bei welcher in eine durch ihre dunkle Farbe kontrastierende Grundmasse glashelle, bezw. weiße Objekte eingelassen wurden, die zufolge ihrer Dicke über die Fläche der Grundmasse etwas hinausragen.

Neben dem soeben erwähnten prinzipiellen Unterschied gegenüber den üblichen Färbungspräparaten besteht aber noch ein zweiter, für die

Zwecke unseres Verfahrens ebenso schwerwiegender. Beim Färbepräparat werden die Bakterien, beim Tuschepunktverfahren wird die Umgebung der Bakterien gefärbt, um eine gewisse Kontrastwirkung zu erzeugen. Auf welcher Seite der Vorteil liegt, braucht nicht erst gesagt zu werden. Um die Bakterienzelle so zu färben, daß sie auch unter schwierigen Verhältnissen gut als solche erkannt werden kann, müssen wir sie erst abtöten. Um aber eine leichte Erkennung einer einzelnen Zelle auf Grund des mit der Tuscheanwendung erzielten Kontrastes zu ermöglichen, können wir uns aller groben Eingriffe in das Zellleben enthalten. Es könnte sich höchstens um die Frage handeln, ob die Berührung der Mikroorganismenzelle mit der flüssigen Tusche vom Augenblick der Herstellung der Verdünnungen bis zum Eindunsten des Tröpfchens oder das Eingezwängtsein in den kuchenförmigen Eindunstungsrückstand, wobei die Zelle sich in ähnlicher Lage wie ein Stein im Asphalt der Straße befindet, von erheblich ungünstigem Einfluß sein könnten.

Was die Berührung der Zelle mit der flüssigen Tusche betrifft, so kämen hier vor allem chemische Einflüsse in Frage, die sich im Sinne einer Schädigung geltend machen könnten. Solche wären zwar weniger von den wesentlichen Bestandteilen der Tusche, den Kohlenteilchen und ihrem Bindemittel, als von gewissen Zusätzen zu erwarten, die etwa zu Aromatisierungs- oder Konservierungszwecken bei der Fabrikation Verwendung finden.

Bei meinen ersten Versuchen schon gewann ich den Eindruck, daß wenigstens bei dem verwendeten Günther Wagnerschen Präparat entwicklungshemmende Substanzen keine bedeutende Rolle spielen. Diese Versuche waren ausgeführt mit verschiedenen Stämmen von Bact. coli, Streptococcus Güntheri Lehm. et Neum. (= Bact. lactis acidi Leichm. = Streptococcus lacticus Kruse), Bact. aërogenes und Micrococcus-Arten. Zu wiederholten Malen war mir aufgefallen, daß in großen Tuschepunkten, die nur zu Uebungszwecken hergestellt worden waren und die zufällig eine größere Zahl von Bakterien enthielten, nach etwa 15 Stunden keine einzige Zelle zu finden war, die sich nicht zu einer ansehnlichen Kolonie entwickelt hatte. Derartige Befunde waren geeignet, die Meinung aufkommen zu lassen, daß die von mir benutzte Tuscheverdünnung für die Bakterien im allgemeinen eine im biochemischen Sinne absolut indifferente Flüssigkeit sei, eine Meinung, die noch bestärkt wurde durch den Umstand, daß Auskeimungsresultate obiger Güte sich auch erzielen ließen, als die Bakterien nicht nur einige Minuten, sondern Stunden und Tage mit der Tusche in Berührung gelassen wurden. Ja, in einigen Fällen kam es vor, daß die aus einer keimhaltigen Tusche bestimmter Verdünnung hergestellten Tuschepunkte sofort nach Bereitung des schwarzen Gemisches entschieden weniger Keime enthielten als ungefähr gleich große Punkte, die man nach 24-stündigem Stehen des Gemisches angefertigt hatte. Solche Befunde wurden im besonderen bei Bact. coli gemacht und es gewährte mir große Befriedigung, daß gerade für die so wichtige und umfangreiche Coli-Gruppe bezüglich der Verwendung von Tusche zu Isolierungszwecken keine Einschränkung zu befürchten war.

Anders als bei den Kokken und nicht sporenbildenden Kurzstäbchen schienen die Verhältnisse aber bei den langstäbchenförmigen Milchsäurebakterien vom Typus des Bac. caseï ε v. Freud., des Bac. bulgaricus etc., und namentlich bei den sporenbildenden Erdbakterien (Bac. mycoides, Bac. megatherium, Bac. mesentericus)

zu liegen. Bei diesen Arten schien das Verfahren, das bisher mit so schönem Erfolg auf die früher erwähnten Nichtsporenbildner angewendet worden war, gänzlich versagen zu wollen. Namentlich die Sporenbildner erwiesen sich als auffallend empfindlich und lagen tagelang in den Tuschescheibchen, ohne die geringste Spur einer vegetativen Tätigkeit erkennen zu lassen. Ich zog aus diesem Verhalten den nächstliegenden Schluß, daß im Tuschegemisch entwicklungshemmende Substanzen tatsächlich nicht fehlen, daß aber die Empfindlichkeit bestimmter Bakteriengruppen diesen gegenüber eine sehr verschiedene sei. Unter Zugrundelegung dieser Annahme bemühte ich mich, das Verfahren so einzurichten, daß die Zeit, während welcher die Keime mit der flüssigen Tusche in Berührung waren, auf ein Minimum eingeschränkt wurde. Dies gelang mir durch Herstellung der verschiedenen Verdünnungen in der Art und Weise, wie sie im Abschnitt über „die derzeitige Form des Verfahrens“ beschrieben wurde. Die für die betreffende Operation in Anspruch genommene Zeit beträgt höchstens 1 Minute. Daß das Verbesserungsbestreben am richtigen Punkte eingesetzt hatte, bewies der Erfolg. Denn nun war es möglich, wenigstens für Bac. megatherium und Bac. mycoides durchaus befriedigende Keimprozente zu bekommen, während Bac. mesentericus noch immer keine Neigung zeigte, unter Verhältnissen, wie sie das Tuschepunktverfahren bedingt, auszuwachsen. Die benützte Kultur war wie bei megatherium und mycoides ein seit über einem Jahr im Laboratorium gezüchteter Stamm, der außer einem etwas kümmerlichen Wachstum keine auffallenden Degenerationszeichen erkennen ließ. Daß er immerhin nicht als normal vegetationskräftig gelten konnte, zeigte sich, als wir die Versuche mit einem frisch aus Erde isolierten Stamm wiederholten. Jetzt gelang es öfters, unter Einhaltung der früher beschriebenen Maßregeln, in den Tuschepunkten nach 24 Stunden gegen 50, in einem bestimmten Fall sogar 100 Proz. ausgekeimte Stäbchen zu zählen. Durch diesen Versuch scheint die Tatsache von neuem bestätigt, daß ein Laboratoriumsstamm irgendeiner Bakterienart noch ganz leidlich fortpflanzungsfähig und dabei doch schon in bestimmter Weise, wenn auch nicht äußerlich hervortretend, geschwächt sein kann.

Um festzustellen, ob die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber gewissen Bestandteilen der Tusche vielleicht ein Gruppenmerkmal für die peptonisierenden Bakterien überhaupt sei, prüfte ich nachträglich das bisher für die Versuche nicht herangezogene Bact. fluorescens liquefaciens. Dabei zeigte sich aber sofort, daß das Auskeimungsvermögen dieser Art gleich dem der übrigen untersuchten Nichtsporenbildner war; mit Mühe konnte man bei Durchmusterung der Tuschepunkte nach 15 Stunden ein Stäbchen finden, das nicht ausgekeimt war. Es scheint also die höhere Empfindlichkeit lediglich den vegetativen Formen der Sporenbildner und einigen ebenfalls dem Typus der Langstäbchen angehörenden, aber nicht sporenbildenden Formen anzuhaften. In diesen Verhältnissen dürfte vielleicht die Tatsache zum Ausdruck kommen, daß die Nichtsporenbildner durchschnittlich überhaupt kräftiger konstituiert sind als die vegetativen Formen der Sporenbildner. Dafür fehlt ihnen das den letzteren zur Verfügung stehende Mittel, sich unter ungünstigen äußeren Bedingungen in gegen Schädigungen aller Art sehr resistente Dauerformen zu verwandeln und in diesem Zustand sozusagen beliebige Zeit zu verharren, um bei Eintritt günstiger Entwicklungsbedingungen wieder in die vegetative Form überzugehen. Die hier angedeuteten Unter-

schiede zwischen Nichtsporenbildnern und vegetativen Formen der Sporenbildner haben wir übrigens bei anderen Versuchen, welche mit den vorliegenden in keinem Zusammenhange stehen, bestätigen können, und auch die weitläufige Literatur über Prüfung entwicklungshemmender Substanzen liefert hierfür mannigfache Belege.

Die Wahrnehmung, daß gewisse Bakterienarten infolge längerer Berührung mit der verdünnten flüssigen Tusche ihr Entwicklungsvermögen anscheinend eingebüßt hatten, rief dem Wunsche nach einem Tuschepräparat, das keine konservierenden Zusätze enthielt. Die Firma Günther Wagner hatte die Freundlichkeit, auf eine diesbezügliche Anfrage mir ein Präparat zur Verfügung zu stellen, das nur durch Hitze sterilisiert worden war. Dieses Präparat benützte ich neben dem Handelsprodukt derselben Firma, um einige vergleichende Versuche anzustellen. Das Ergebnis war insofern nicht meinen Erwartungen entsprechend, als auch die ohne Konservierungsmittel zubereitete Tusche auf den für den Versuch benützten Mesentericus-Stamm eine gewisse entwicklungshemmende Wirkung äußerte, ja, es ließ sich keine deutliche Ueberlegenheit gegenüber der zum Vergleich herangezogenen Tusche des Handels nachweisen. Die letztere hat also wohl infolge der Sterilisation im Autoklaven das offenbar flüchtige Antiseptikum zum großen Teil verloren, und der Rest war durch die vorgenommene Verdünnung mit Wasser bedeutungslos geworden[1]). Andererseits muß aber in beiden Tuschesorten noch irgendein hemmendes Agens vorhanden sein, das zwar nur auf die allerempfindlichsten Organismen zu wirken scheint. Die beobachteten Hemmungen können kaum anders gedeutet werden; denn die Annahme, daß bestimmte Keimarten den Zwang, den die Existenz im trockenen Tuscheplättchen für sie bedeutet, nicht ertragen können, fällt dahin, wenn man bedenkt, daß gerade der mehr oder weniger lange Aufenthalt der Organismen in der flüssigen Tusche für ihr Auskeimen oder Nichtauskeimen maßgebend ist.

c) Die Beschaffenheit des Aussaatmaterials.

Als selbstverständliche Forderung gilt, daß man für die Herstellung von Einzellreinkulturen nur vegetationskräftiges Keimmaterial verwenden soll und solches ist in erster Linie in jungen Kulturen zu finden. Diese brauchen nicht durchaus in Form von Gelatine-, Agar-, Kartoffel-, Bouillon- etc. Reinkulturen der üblichen Form vorhanden zu sein; es können auch sogenannte Vorkulturen oder Anreicherungskulturen verwendet werden; nur muß die zu isolierende Keimsorte darin einigermaßen vorherrschend sein. Es wird unter Umständen sogar möglich sein, aus natürlichen keimhaltigen Flüssigkeiten, wie z. B. aus Trinkwasser, aus pathologischen Exsudaten usw. direkt Einzell-Reinkulturen zu erhalten, doch tritt in solchen Fällen die eventuelle Keimarmut hindernd in den Weg oder die die Keime begleitenden körperlichen Teilchen aller Art wirken im Tuschetröpfchen störend und verhindern das sichere Erkennen eines einzelnen Keims. In der Regel wird man bei

---

1) Trotz dieses Ergebnisses wird man im allgemeinen das Arbeiten mit einer antiseptikumfreien Tusche vorziehen; die genannte Firma hat sich bereit erklärt, ein solches Präparat, für welches auch noch bezüglich Reinheit und Gleichmäßigkeit der Beschaffenheit eine erhöhte Garantie geboten würde, herzustellen. Der Bezug hat, wie bereits auf S. 14 bemerkt wurde, durch Dr. Grübler & Comp. in Leipzig zu erfolgen. Das Präparat trägt die Bezeichnung Pelikan-Tusche Nr. 541.

Herstellung von Bakterien-Einzellkulturen nach dem Tuschepunktverfahren von gewöhnlichen Reinkulturen in Form junger Gelatine- oder Agarstrichkulturen ausgehen. Diese bieten den Vorteil, daß in großen Massen ein Zellenmaterial zur Verfügung steht, das im allgemeinen frei von störenden Elementen, wie festen Ausscheidungsprodukten, Nährbodenteilchen und dergl. ist.

Was das Alter der verwendeten Kulturen anbetrifft, so scheint dieses bei vielen Bakterien, so z. B. bei den Vertretern der Coli-Gruppe, innerhalb ziemlich weiter Grenzen nicht von großem Einfluß zu sein. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse von Auskeimungsversuchen zusammengestellt, die mit Bact. coli, das auf Schrägagar bei 30° C gewachsen war, vorgenommen wurden. Die Agarstrichkultur wurde in verschiedenem Alter verwendet und die Keime wurden absichtlich verschieden lange Zeit mit der verdünnten Tusche in Berührung gelassen. Die Tuschepunkte enthielten mehrere Stäbchen, aber nur so viele, daß die einzelnen in ihrem Verhalten sicher beobachtet werden konnten. Selbstverständlich entfällt die in der Tabelle jeweils angegebene Zahl der untersuchten Stäbchen auf mehrere Tuschepunkte.

Auskeimung von Bact. coli im Tuschepunkt.

Alter der Kultur	Alter des keimhaltigen Tuschegemisches	Zahl der beobachteten Stäbchen	Zahl der nach 15 Std. zu Kolonien ausgewachsenen Stäbchen	Zahl der ausgewachsenen Stäbchen in Prozenten der beobachteten Stäbchen Proz.
8 Std.	5 Min.	55	53	96,4
	2 Std.	52	47	90,4
	24 "	100	95	95,0
	48 "	90	87	96,7
32 Std.	5 Min.	63	56	88,9
	2 Std.	104	103	99,0
	24 "	103	100	97,1
	48 "	102	99	97,1
56 Std.	5 Min.	64	60	93,8
	2 Std.	104	92	88,5
	24 "	100	76	76,0
	48 "	101	95	94,1
1 Woche	5 Min.	99	98	99,0
	2 Std.	28	25	82,2
	24 "	102	100	98,0
	48 "	100	25	85,0

Das sind Keimungsergebnisse, die auf ein vegetationskräftiges Saatmaterial schließen lassen. Geradezu auffallend ist die Tatsache, daß aus der 1 Woche alten Kultur noch fast alle Keime entwicklungsfähig sind, selbst nachdem sie vor der Aussaat noch 48 Stunden in der verdünnten Tusche gelegen hatten. Aehnliche, bezw. noch bessere Resultate sind mit 1 Woche alten Bouillonkulturen erhalten worden. Hier konnten von 90, 100, 104 und 92 Stäbchen (den 4 Aufbewahrungszeiten des Keim-Tuschegemisches entsprechend) 100 Proz., 98 Proz., 100 Proz. und 100 Proz. ausgekeimte beobachtet werden. Diese Funde sind mit gewissen Anschauungen, wonach in Bakterienkulturen bald nach der ersten

stürmischen Entwicklung ein großes Sterben beginnen soll, nicht gut in Einklang zu bringen.

Daß nicht alle Bakterienarten so unempfindlich gegen den Einfluß der Tusche sind, haben wir am Beispiel der peptonisierenden Sporenbildner gesehen, und man wird gut tun, bei Mikroorganismen, über die in genannter Beziehung noch keine Erfahrungen vorliegen, nur von 1—2 Tage alten Kulturen auszugehen und die Berührungsdauer der Tusche auf ein Mindestmaß zu beschränken.

Schließlich sei erwähnt, daß es Bakterienarten geben kann, die sich zur Verarbeitung auf Einzellkulturen überhaupt nicht eignen. Ich denke dabei an gewisse schwierig zu kultivierende Typen, wie die Zellulosevergärer, die schon zur Fortzüchtung in Rohkulturen die Uebertragung von verhältnismäßig viel Impfmaterial erfordern; auch gewisse pathogene Arten, wie z. B. der Tuberkelbacillus, werden für gewöhnlich nicht mit Hilfe von Verdünnungen nach dem Plattenverfahren isoliert, sondern auf dem Wege der Massenimpfung aus natürlich reinem oder annähernd reinem Ausgangsmaterial. Es scheint, daß für gewisse Mikroorganismen das Losreißen einer Zelle von ihresgleichen und der gewohnten Umgebung schon eine Schädiguug bedeutet, die durch keine noch so günstig gestaltete Entwicklungsbedingungen kompensiert werden kann. Auch für die obligat anaëroben Arten besteht im allgemeinen die Anschauung, daß reichliche Ueberimpfungen ein unbedingtes Erfordernis für das Angehen der Kulturen sei, doch dürften hier die Verhältnisse meistens so liegen, daß bei passender Ernährung und richtig abgestuften Sauerstoffverhältnissen auch von kleinen Impfmengen und sogar von der einzelnen Zelle aus eine kräftige Kultur gewonnen werden kann. Jedenfalls sind die Fälle, wo der Herstellung von Einzellkulturen unüberwindliche Hindernisse im Wege stehen, selten und liegen nicht in der Unvollkommenheit des Tuschepunktverfahrens, sondern, wie angedeutet wurde, in andern Verhältnissen begründet.

d) Der feinere Mechanismus des Verfahrens.

Nachdem wir einige Eigenschaften der flüssigen Tusche in ihren Beziehungen zum vorliegenden Isolierungsverfahren hervorgehoben und das Verhalten einiger wichtiger Bakteriengruppen bei dessen Anwendung kurz behandelt haben, dürfte es sich lohnen, die Einzelheiten des Isolierungsvorganges vom mehr mechanischen Standpunkte näher ins Auge zu fassen. Gerade diese Seite des Verfahrens ist für dessen verständnisvolle Anwendung wichtig und ihre Nichtkenntnis könnte unter Umständen eine Quelle von Mißerfolgen sein.

Die Entstehung eines Tuschetröpfchens von der Art, wie wir es für die Zwecke der Einzellkultur brauchen, setzt eine vollständig ebene Gelatinefläche voraus, und zwar soll die Gelatine einen bestimmten Grad von Festigkeit haben. Es sei nochmals betont, daß der Herstellung tadelloser Tuschepunkte kein größeres Hindernis im Wege stehen kann, als eine halbweiche Gelatine. In diesem Falle reagiert der Leim des Tuschetröpfchens mit dem bezüglich Salzgehalt etc. etwas anders beschaffenen Leim der Nährgelatine. Es kommt zu einer Strukturstörung im erstern; die Rußteilchen büßen ihre gleichmäßige Verteilung ein und nach dem Eintrocknen zeigt das Scheibchen anstatt der homogenen Beschaffenheit ein mehr oder weniger körniges Aussehen, das selbstverständlich der Betrachtung kleinster organisierter Elemente nicht günstig

ist. Unter allen Umständen ist es daher ratsam, im warmen Zimmer die gegossenen Gelatineplatten auf dem Kühlapparat zu behalten, bis man mit den vorbereitenden Arbeiten so weit ist, um die Punkte herzustellen.

Daß die Tuschepunkte auf Gelatine abgesetzt werden, ist nicht eine zufällige oder willkürliche Abänderung des sonst üblichen Aufbringens von keimhaltigen Tröpfchen auf Objektträger oder Deckglas, sondern ein charakteristischer und in den mit dem Zerstäubungsverfahren ausgeführten Vorversuchen begründeter Bestandteil der Tuschepunkt-Einzellkultur. Auf Glas gebrachte Tuschepunkte sind nämlich nicht zu gebrauchen, weil beim Absetzen des Tröpfchens die Flüssigkeit zentrifugal in der Weise verläuft, daß in der Mitte eine hellgefärbte Scheibe bleibt, in der die Bakterien mangels der Kontrastwirkung schwierig zu erkennen wären, während sich die Hauptmasse der schwarzen Teilchen am Rande in einer ringförmigen Zone ansammelt, in welcher die Bakterien ebenfalls nicht zu sehen sind, weil jene zu dick und undurchsichtig ist. Nur die Gelatineoberfläche bildet eine geeignete Basis für die Herstellung brauchbarer Tuschepunkte. Hier verläuft das Tröpfchen rasch zu einer meistens kreisförmigen, überall ungefähr gleich dicken Flüssigkeitsscheibe, die in wenigen Sekunden durch Verdunstung und vielleicht auch durch Aufsaugung der Feuchtigkeit durch die Gelatine in einen ebensolchen Trockenrückstand übergeht. Eigentlich trocken haben wir uns dieses scheibenförmige Tuscheplättchen nicht vorzustellen, denn da die Unterlage, d. h. die Gelatine selbst, gegen 90 Proz. Wasser enthält, so wird auch das Tuscheplättchen in gewissem Grade feucht und plastisch bleiben.

Bei dieser Gelegenheit sei bemerkt, daß Agarplatten an Stelle der Gelatineplatten deshalb nicht zu gebrauchen sind, weil das an der Oberfläche nicht zu alter Platten beständig vorhandene sogenannte Kondenswasser die Herstellung eines normalen homogenen Tuschescheibchens nicht erlaubt.

Nach früher Gesagtem, dem übrigens die Photogramme der beigefügten Tafeln als vollgültiger Beleg zur Seite stehen, erscheint das Tuscheplättchen im Mikroskop als hell- bis dunkelbraune Scheibe, aus welcher die Bakterien blendend weiß in die Augen stechen. Schon dieses Bild sagt uns, daß sowohl über als unter dem Bakterium schwarze Tuscheteilchen in nennenswerter Menge nicht liegen können, ansonst die auffallende Durchsichtigkeit gestört werden müßte. Das mikroskopische Bild würde zwanglos durch die Annahme erklärt, daß die Bakterienzelle beim Eintrocknen des Tuschetröpfchens unten direkt auf die Gelatineoberfläche zu liegen kommt, während der obere Teil auf Grund des Umstandes, daß die Dicke der Bakterienzelle größer ist als die Dicke des Tuscheplättchens oder Tuschescheibchens, die Oberfläche des letzteren überragt. Ein Modell, das diese Verhältnisse einigermaßen illustriert, kann man sich herstellen, indem man Gelatine im flüssigen Zustande durch Zufügung von Tusche schwarz färbt und das Gemisch in eine Petrischale mit vollkommen flachem Boden gießt. Bevor durch Abkühlung Erstarrung eingetreten ist, legt man in die schwarze Flüssigkeit einige etwa doppelt so lange als dicke Glasstäbe, die Bakterien darstellen mögen, rollt diese einige Male hin und her, läßt sie dann liegen und die schwarze Gelatine zur Erstarrung kommen. Die gegen das Licht gehaltene Schale zeigt nun die Stäbchen ganz deutlich, obgleich

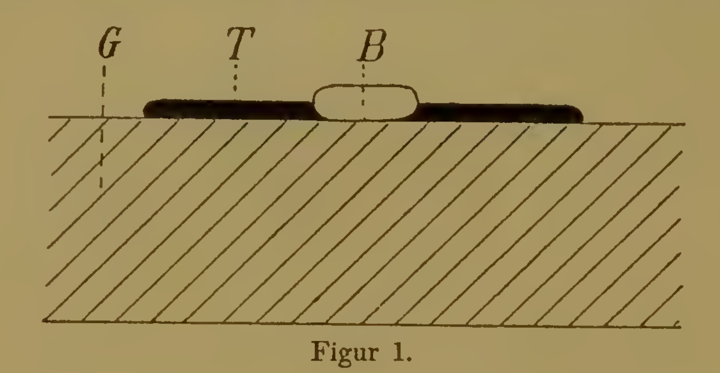
eine ganz dünne Schicht der schwarzen Gelatine auch die überragenden Stäbchenteile überzieht und eine ebenso dünne Schicht sich zwischen der aufliegenden Stäbchenfläche und dem Boden der Petrischale befinden muß. Auch beim Tuschepunkt ist anzunehmen, daß Bestandteile der Tusche sowohl auf dem die Tuschefläche überragenden Teil der Bakterienzelle als auch zwischen dieser und der Gelatineunterlage hingekommen sind. Doch scheint es sich hier nur um ein unendlich feines Häutchen von durchsichtiger Beschaffenheit zu handeln, während die eigentlichen Tuscheteilchen, d. h. die Rußteilchen, von der Zellmembran abgeglitten sind. Auf dieses Häutchen, das wir uns als Fortsetzung der die Mikroorganismen seitlich umschließenden Tuschemasse zu denken haben, wird an anderer Stelle zurückzukommen sein.

Für die aus dem mikroskopischen Bild sich ergebende Annahme, daß die Bakterienzelle dicker sei als die Eintrocknungsschicht eines gelungenen Tuschepunktes, haben wir verschiedene Beweise. Zunächst wäre die Tatsache zu erwähnen, daß das auffallend weiße glasige Aussehen der Bakterien nicht in die Erscheinung tritt, wenn man außerordentlich kleine, bezw. außerordentlich dünne Formen dem Tuschepunktverfahren unterwirft. Die Zellen von Spirillum parvum v. Esm. z. B. zeigen fast regelmäßig diesen Mangel an Kontrast, ebenso andere schlanke Formen, wie sie bei gewissen Fluorescens-Stämmen und unter Umständen sogar bei einzelnen Coli-Stämmen vorkommen können. In allen diesen Fällen handelt es sich um Bakterien, welche die Dicke von $^1/_2\ \mu$ kaum erreichen und aus diesem Grunde offenbar von der Tuscheschicht bedeckt werden. Man sieht dann die Zelle wie unter einem Schleier, aber immerhin mit genügender Deutlichkeit. Etwas ganz ähnliches kann auch bei dicken Bakterien auftreten, z. B. bei $^3/_4\ \mu$ dicken Coli-Zellen in der Randpartie des Tuschescheibchens, wenn dieses aus einem zu stark konzentrierten Tuschegemisch hergestellt worden ist. Die Ausbreitungsschnelligkelt auf der Gelatinefläche ist dann gehemmt und es kommt infolge der Dickflüssigkeit in der peripherischen Zone zu Stauungen, welche eine mehr als normale Dicke der Scheibchen zur Folge haben. Sehr interessant ist in dieser Richtung auch das Verhalten von gewissen Spirillen. Da die längeren Schrauben nur mit einem kleinen Teil der Schraubengänge auf der Gelatine aufliegen, ragen die entsprechenden oberen Stücke selbstverständlich über die Tusche hinaus. Sie ziehen aber offenbar etwas von dem schwarzen Material in die Höhe, so daß die unten aufliegenden Schraubenstücke mehr oder weniger von der Tusche bedeckt sind, was dem ganzen Gebilde ein eigenartig scheckiges Aussehen gibt. Ganz ähnliches ist zu sehen, wenn sich zwei Stäbchen kreuzen, die einzeln liegend, sehr schön hell zur Geltung gelangen würden. Es kommt dann an der Kreuzungsstelle beim Eintrocknen des Tuschetröpfchens zu einer Stauung, indem die Flüssigkeit bestrebt ist, die kapillaren Räume bis zum höher liegenden Stäbchen auszufüllen, was zur Folge hat, daß gerade hier die Eintrocknungsschicht eine genügende Mächtigkeit erreicht, um das tiefer liegende Stäbchen wenigstens auf eine kurze Strecke zu bedecken. Die Kreuzungsstelle selbst aber leuchtet besonders stark, weil sie wie ein Zellelement von doppelter Dicke wirkt, welches das Niveau des Tuschekuchens auf jeden Fall überragt. Beispiele hierfür liefern einige Photogramme der Tafel III, insbesondere No. 7 und 12; ähnlich ist auch das starke Hervortreten der Tetanussporen bei No. 8 zu erklären. Alle diese Beobachtungen deuten unzweifelhaft darauf hin, daß das aus dem Tuschetröpfchen ent-

stehende Tuscheplättchen von sehr geringer Dicke ist. Durch den Umstand, daß gewisse Bakterien, die wir messen können, unter der Oberfläche des beim Eintrocknen entstehenden Scheibchens verbleiben, während andere darüber hinausragen, sind wir auch in der Lage, ein Maß für die Schichthöhe des Tuscherückstandes anzugeben; diese beträgt ungefähr $^1/_2\,\mu$. Durch diese Verhältnisse erklärt sich die kaum zu übertreffende Prägnanz der Bakterienbilder im Tuschepunkt von selbst.

Eine schematische Darstellung der Lage eines Bakteriums im Tuschepunkt im Querschnitt zeigt Fig. 1. Wie auch bei den folgenden Figuren bedeutet G Gelatine, T Tuschescheibe, B Bakterium. Das dünne Häutchen, von dem weiter oben die Rede war und das, von der Tuschescheibe ausgehend, die Bakterienzelle sackartig umschließen soll, ist hier der Einfachheit halber weggelassen.

Etwelche Umgestaltung der Lagerungsverhältnisse muß Platz greifen, wenn ein Deckglas auf die Tuschepunkte gelegt wird. Bei diesem Vorgang kommt die Adhäsionskraft zur Geltung, welche bestrebt ist, das Deckglas fest an die Gelatinefläche anzupressen. Da nun die Oberflächen



Figur 1.

der Tuschepunkte die Gelatine überragen und die ersteren wiederum durch die obere Fläche der Bakterien überragt werden, so muß zunächst auf die Bakterien und durch diese auf den Tuschekuchen ein Druck ausgeübt werden, welchem die verhältnismäßig weiche und elastische Gelatine keinen bedeutenden Widerstand entgegensetzen kann. Tuschekuchen und Bakterienzelle sind wahrscheinlich in der Art ziemlich fest miteinander verbunden, daß die letztere vom ersteren wie von einer eng anliegenden Kittmasse umschlossen ist. Immerhin darf nicht vergessen werden, daß der Tuschekuchen auf einer stark wasserhaltigen Unterlage ruht und daher eine gewisse Plastizität, etwa ähnlich wie frischer Glaserkitt, zeigen dürfte. Es ist also wohl denkbar, daß da, wo das Deckglas auf der Bakterienzelle lastet, der Kuchen eine entsprechende Durchbiegung erfährt, wie das in Fig. 2 angedeutet ist, welche einen schematischen Vertikalschnitt durch den in Fig. 1 dargestellten Tuschepunkt nach Auflegen des Deckglases D zeigt. Nur auf die angedeutete Weise kann man sich vorstellen, daß nicht sowohl das Bakterium als erster mit dem Deckglas in Berührung kommender, die Gelatinefläche überragender Körper, sondern auch die Tuschescheibe in so vollkommener Weise am Glase haftet, wie dies erfahrungsgemäß zu geschehen pflegt.

Was nun beim Entfernen des Deckglases geschieht, ist schon in den früheren Erörterungen wiederholt erwähnt und erscheint als selbstverständliches Ergebnis der soeben gemachten Betrachtungen. Der klebrige Tuschekuchen samt der Bakterienzelle haftet viel besser am

trockenen Glase als auf der feuchten Gelatine, d. h. er geht bei Entfernung des Glases einfach mit, so daß das von der Gelatine abgehobene Deckglas mit seinem Anhängsel der Fig. 3 entspricht. Dieses Bild verkörpert das Endstadium des Isolierungsvorganges und gleichzeitig die unbeschränkte Transportfähigkeit des isolierten Keims. Das Deckglas bezw. ein kleiner Glassplitter, der an der Unterseite einen mittels

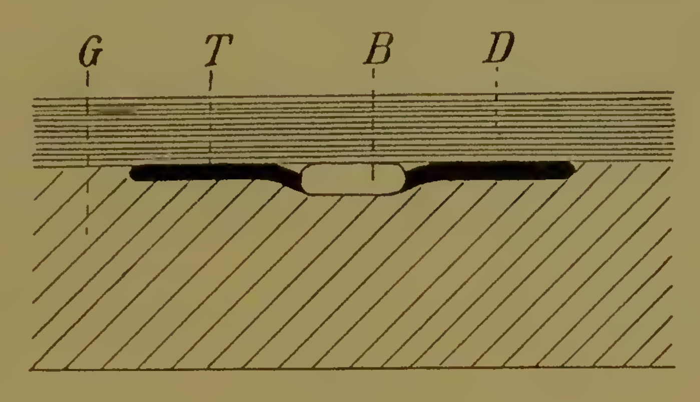


Fig. 2.

der Tuschescheibe angehefteten Keim enthält, kann entweder auf der Gelatine, wenn diese eine Nährgelatine ist, liegen bleiben, oder er kann in beliebiger Weise auf einen anderen festen oder flüssigen Nährboden übertragen werden.

Auf festen durchsichtigen Nährböden hat man die Möglichkeit, die Entwicklung der ausgesäten Zelle Schritt für Schritt zu verfolgen, und bei dieser Gelegenheit zeigen Stäbchen ein besonders instruktives Verhalten. Während nämlich das Mutterstäbchen sein leuchtend weißes Aussehen beibehält, entwickeln die Tochterstäbchen sehr wenig Glanz und Helligkeit, ja, es ist unter Umständen mit einiger Schwierigkeit verbunden, sie deutlich zu erkennen. Man hat den Eindruck, als ob sich die jungen Stäbchen hinter einem Schleier befänden und in der Tat ist dies der Fall. Die Entwicklung der Kolonie spielt sich naturgemäß unter der Tuschescheibe ab und die mikroskopische Betrachtung

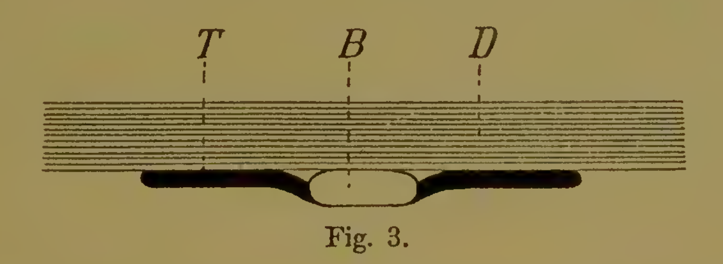


Fig. 3.

des Vorganges kann nur durch das verdunkelnde Medium stattfinden. Sehr schön ist dieses verschleierte Bild bei der jungen Coli-Kolonie bei Phot. 2 auf Tafel II zu sehen, während die mit Phot. 2 auf Tafel I dargestellte junge Kokkenkolonie eine große Zahl durchaus weißer Zellen aufweist, was damit zusammenhängt, daß die Nachkommenschaft der Kokkenzelle sich in kugelige Form gruppiert und so die Tuschescheibchen durchbricht, bezw. die Tuscheteilchen zur Seite drängt.

Nach der ursprünglichen Lage der Zelle zu schließen (vergl. Fig. 2) ist das Hinabwachsen unter die Tuschescheibe notwendig mit einer chemotropischen Bewegung verbunden, und die Tuscheschicht muß vom Mikroorganismus auf jeden Fall durchbrochen werden. Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß die Bakterienzelle nicht etwa mit der unteren Seite unmittelbar auf der Gelatine aufliegt, sondern durch ein dünnes Häutchen von dieser getrennt ist, das man sich als eine von Kohlenpartikelchen freie Fortsetzung des Tuschekuchens zu denken hat. Von der Existenz eines solchen, die Bakterienzelle umschließenden, aber mit ihrer äußersten Membranschicht nicht etwa identischen Häutchens kann man sich überzeugen, wenn man ein Deckglas mit bakterienhaltigen Tuschepunkten von der Gelatine abhebt, lufttrocken werden läßt und in gewöhnlicher Weise nach vorheriger Fixierung in der Flamme mit einer wäßrigen Anilinfarblösung, z. B. Fuchsin, behandelt. Die Stäbchen im Tuschepunkt bleiben dabei vollständig weiß; sie sind vor dem Zutritt der Farbe durch irgend etwas, was zwischen ihnen und den Molekülen des Farbstoffes liegt, geschützt. Besonders deutlich tritt diese Eigentümlichkeit hervor, wenn wir ein Präparat mit Tuschepunkten verwenden, in dem einzelne Stäbchen zu Kolonien ausgewachsen sind, andere aber nicht. Die letzteren Stäbchen, wie die Mutterstäbchen der jungen Kolonien bleiben dann weiß, während die Tochterstäbchen, weil jenseits der Tusche liegend, die Farbe in normaler Weise angenommen haben und durch die Tuscheschicht gesehen, ein dunkel-braunrotes Aussehen haben. Wenn nun auch das Fuchsin nicht durch das erwähnte Häutchen zu dringen vermag, so ist damit nicht gesagt, daß gewisse andere Stoffe, z. B. Nährstoffe aus der Gelatine, nicht durchzudringen und zu der Bakterienzelle zu gelangen vermögen. Das letztere ist sogar sehr wahrscheinlich mit Rücksicht auf das prompte Auskeimen der Zelle der verbreitetsten Bakterienarten und es scheint demnach bei diesem Häutchen eine Membran von elektiver Permeabilität vorzuliegen. Weitere Untersuchungen über dieses Häutchen, das wahrscheinlich als Reaktionsprodukt der äußeren Membranschichten der Bakterienzellen mit gewissen Bestandteilen der flüssigen Tusche aufzufassen ist, dürften nicht ohne Interesse sein.

Aus demselben Grunde, aus welchem die Tuschescheibchen besser am Deckglase als an der Gelatine haften, bleiben auch die eine junge Kolonie zusammensetzenden Bakterien besser an dem Tuschescheibchen, unter welchem sie gewachsen sind, als an der Gelatine kleben. So kommt es, daß, wenn man mit der Entfernung des Deckglases bis zur vollzogenen Entwicklung der Kolonie wartet, nicht nur das Tuschescheibchen mit dem Deckglas die Gelatine verläßt, sondern daß anscheinend auch die ganze junge Kolonie an der Unterseite des Tuschescheibchens kleben bleibt. Auch dieses ist keine sehr überraschende Erscheinung, wenn man sich daran erinnert, wie leicht und vollständig auf der Gelatineoberfläche gewachsene Bakterien bei der Herstellung der sogenannten Klatschpräparate sich von dem feuchten Nährsubstrat entfernen lassen. Uebrigens ist die vollständige Entfernung der jungen Kolonie mittels des Tuschescheibchens nur eine Täuschung. Was mit dem Tuschescheibchen geht, ist nur die oberste Bakterienschicht. Eine gewisse Anzahl von Zellen ist gewöhnlich schon mehr oder weniger in die Gelatine eingedrungen und bleibt natürlich beim Entfernen des Deckglases zurück. Man kann sich sicher darauf verlassen, daß an der Stelle, wo sich eine Zelle im Tuschepunkt zur Kolonie ausgewachsen

hat, nach Entfernung des Deckglases in einiger Zeit eine Kolonie entwickeln wird, die natürlich ebenso den Charakter der Einzellkultur hat wie die am Deckglas, bezw. am Tuschescheibchen haften gebliebene Kolonie.

II. Anderweitige Verwendbarkeit des Tuscheverfahrens.

Nachdem sich das Prinzip der mikroskopischen Betrachtung von Bakterien im Tuschescheibchen bei der Herstellung von Einzellkulturen als außerordentlich nützlich erwiesen hat, ist die Frage naheliegend, ob die Untersuchung der Bakterien in Tusche nach angegebener Weise nicht überhaupt im Dienste der mikrobiologischen Forschung mit Vorteil verwendet werden könnte. Das Tuschepunkt-Einzellverfahren ist im Grunde nur eine Anwendung der Aufgabe, lebende Bakterien möglichst deutlich und in einer jeden Zweifel der Verwechslung mit ähnlich geformten Elementen ausschließenden Weise zur Anschauung zu bringen. Die Lösung dieser Aufgabe schließt aber nicht bloß die Möglichkeit der Gewinnung von Einzellkulturen in sich, sondern eröffnet, wie wir sehen werden, noch andere Perspektiven.

1. Das Tuscheverfahren als Mittel zum Studium der Entstehung und feineren Struktur der Bakterienkolonien.

Als eine durch die Anwendung des Tuscheverfahrens in vorgeschlagener Form erzielte Errungenschaft darf die bequeme Untersuchung der Wachstumsvorgänge bei Bakterien und anderen Mikroorganismen betrachtet werden. Speziell bei Bakterien hat man sich bisher derart beholfen, daß man aus den üblichen Reinkulturen von Zeit zu Zeit Material entnahm, um Teilungsvorgänge, Sporenauskeimung und dergl. beobachten zu können. Diese Arbeitsweise verliert durch das neue Verfahren nichts von ihrem Wert. Was aber bisher nicht möglich war, oder wenigstens nur bei ganz großen Bakterienarten möglich gemacht werden konnte, das ist die schrittweise Verfolgung der Entwicklung einer einzelnen Bakterienzelle zur Kolonie. Zwar ist dem Bau der Bakterienkolonien auf festen Nährböden von jeher große Beachtung geschenkt worden und es ist allgemein üblich, bei Charakterisierung einer Bakterienart das von Kolonien verschiedenen Alters bei schwacher mikroskopischer Vergrößerung erhaltene Bild in Berücksichtigung zu ziehen. Was uns aber fehlte, war die Möglichkeit, die Kolonie in ihren allerersten Anfängen, d. h. im Zeitpunkt der ersten sichtbaren Veränderung der ausgesäeten Zelle zu beobachten, die Gruppierung der jungen Zellen, die kaum in der Zahl von einem Dutzend vorhanden sind, festzustellen, das Bild der Kolonie, wenn sie vielleicht aus hundert Zellen besteht, festzuhalten etc. Eine solche Kolonie dürfte in gewöhnlichen Plattenkulturen mit dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung noch gar nicht aufzufinden sein und wäre der Untersuchung mit stärkeren Systemen überhaupt nicht zugänglich.

Allen diesen Forderungen wird die Tuschepunktkultur gerecht, wenn auch vorläufig nicht in denkbar vollkommenster Weise. So glänzend sich die einzelne Bakterienzelle im Tuschepunkt präsentiert, so schattenhaft nehmen sich oft die neu entstandenen Stäbchen aus. Der Grund hierfür wurde schon an anderer Stelle klargelegt. Die Mutterzelle ist gewissermaßen nur am Rande von der Tuschemasse umfaßt, während

die Tochterzellen sich unter der Tuschescheibe befinden. Es kommt daher, wie leicht einzusehen ist, für die Betrachtung der schrittweisen Entwicklung der Kolonie viel auf die Durchsichtigkeit der Tuschescheibe an. Im voraus bestimmen läßt sich die Farbe, bezw. der Durchsichtigkeitsgrad der Tuschescheibchen im allgemeinen nicht. Gewöhnlich sind diese um so durchscheinender, je kleiner sie sind. Man tut gut, für solche Untersuchungen die Tusche möglichst zu verdünnen, eine Maßnahme, die ohne Bedenken so weit getrieben werden kann, als man noch schön homogene Scheiben erhält. Diese können ganz blaßgelb sein und trotzdem die bekannten Vorteile der Kontrastierung gegenüber den farblosen Bakterien in schönster Weise zeigen. Immerhin möchte ich erwähnen, daß Tuschepunkte vom Durchschnittstypus, wie sie bei dem nach Vorschrift ausgeführten Verfahren entstehen, meistens den Habitus der jungen Kolonie in durchaus deutlicher Weise zeigen.

Soviel ich bis jetzt beobachten konnte, werden sich bei weiterem Studium dieser Verhältnisse mit Leichtigkeit verschiedene „Jugendtypen" der Kolonien aufstellen lassen, die für bestimmte Bakterienarten und -gruppen charakteristisch sind. Mit gleichem Rechte, wie der äußere Habitus und die Struktur der auf festen, durchsichtigen Nährböden entstandenen makroskopischen Kolonien dürfte in Zukunft auch der aus einer zählbaren Schar von Zellen bestehende „Jugendtypus" für diagnostische Zwecke herangezogen werden. In Zusammenhang damit wäre auch die Frage aufzuwerfen, ob das Tuscheverfahren eventuell bei pathogenen Bakterien als Mittel zur Frühdiagnose gute Dienste leisten könnte.

Um diese und ähnliche Fragen zu beantworten, bedarf es umfassender, systematisch angelegter Untersuchungen, welche die Arbeitskraft des Einzelnen übersteigen. Ich muß mich damit begnügen, in dieser Richtung einige Anregung gegeben zu haben.

2. Ersatz der gewöhnlichen gefärbten Ausstrichpräparate durch Tuschepräparate.

Wer das Photogramm einer gut gefärbten Bakterienreinkultur mit dem Photogramm eines Tuschepräparates derselben Kultur vergleicht, wird zunächst von letzterem einen fremdartigen Eindruck bekommen. An die Präparate und Reproduktionen der ersten Art gewöhnt, wird er im Tuschephotogramm ein Bild mit dem Charakter eines Negativs sehen, und in der Tat würde die Umkehrung dieses Bildes mit Hilfe der photographischen Platte ein mit den gewohnten Aufnahmen übereinstimmendes Bild ergeben. Eine nähere Ueberlegung führt aber bald dazu, das Bild in der Tuschescheibe als etwas Natürliches, den wirklichen Verhältnissen Entsprechendes und das Bild des gefärbten Präparates als etwas Unnatürliches, Entstelltes zu erklären. Die Vergleichung der beiden Bilder muß noch mehr zugunsten der Tusche ausfallen, wenn man in Erwägung zieht, daß das Bild der gewöhnlichen Art nur auf Kosten einer Behandlung des Mikroorganismus zustande kommen konnte, die für diesen den Tod bedeutete, während das Tuschebild die lebende Zelle veranschaulicht oder doch veranschaulichen könnte. Was von den durch die photographische Platte wiedergegebenen Bildern gilt, trifft selbstverständlich auch für den vom Auge unmittelbar empfangenen Eindruck und das Präparat selber zu. Bei letzterem fallen noch weitere Vergleichspunkte in Betracht, die wiederum das Tuschepräparat in

vorteilhafterem Lichte erscheinen lassen. Das gute Gelingen ist bei diesem nicht von dem mehr oder weniger ausgesprochenen Farbspeicherungsvermögen des Organismus abhängig, da wir die Bakterien überhaupt nicht, sondern nur ihre Umgebung färben, und ein mehr oder weniger kräftiges Braun der Tusche nicht in die Wagschale fällt. Ein mit diesem Umstand eng verbundener Vorteil ist ferner in der Haltbarkeit der Tuschepräparate zu erblicken. Da hier Ruß-, d. h. Kohlenstoffteilchen die Hauptmasse des färbenden Agens darstellen, so ist ein Verblassen der Präparate durch Zerstörung des Farbstoffes oder durch seine Diffusion in die Umgebung (hier also in das Einbettungsmittel und in die Mikroorganismen selbst) nicht zu befürchten, eine Gefahr, die allen mit den gebräuchlichen Farben gefärbten Bakterienpräparaten droht. Meine zum Teil vor mehr als einem Jahre hergestellten Präparate haben sich bisher in keiner Beziehung verändert.

Wenn auf Grund der angeführten Vorteile das Tuschepräparat unter Umständen das gefärbte Ausstrichpräparat zweifellos mit Vorteil ersetzen kann, so gilt dies doch nur mit einer gewissen Einschränkung. Es sind vor allem die aus Bakterien-Reinkulturen angefertigten Präparate, also die neben den Bakterien selbst keine körperlichen Elemente enthaltenden, welche sich besonders für das Tuscheverfahren eignen, und darunter im besondern jene, bei welchen nur die allgemeinen Formverhältnisse dargestellt werden sollen. Beispiele für die Leistungsfähigkeit des Tuscheverfahrens in dieser Richtung sind in erheblicher Zahl auf der Tafel III zu finden. Handelt es sich um differenzierende Färbung von Zellbestandteilen, also gewissermaßen um Farbreaktionen, dann kann das Tuscheverfahren als Ersatzmittel für die Färbung selbstverständlich nicht in Frage kommen. Allenfalls wäre zu untersuchen, ob sich Tuscheverfahren und Bakterienfärbung nicht in geeigneter Weise verbinden ließen, um die Farbenwirkung durch Kontrast mit der dunklen Tusche zu erhöhen.

3. Nachweis der Spirochaete pallida und anderer schwierig erkennbarer Mikroorganismen.

Das Tuscheverfahren hat sich auch bei Präparaten, die aus den verschiedenartigsten körperlichen Elementen zusammengesetzt sind, in einem unerwarteten Maße brauchbar gezeigt. Es hat mir z. B. bei Untersuchung des Gewebebreis aus dem Hinterleib von an Faulbrut zugrunde gegangenen Bienenlarven gute Dienste geleistet. Als ich die trübe Gewebeflüssigkeit in passender Verdünnung mit Tusche mischte, konnte ich in den auf übliche Weise hergestellten Punkten nicht nur die einzelnen Sporen des schwierig zu kultivierenden Faulbrutbacillus sehr schön erkennen, sondern es gelang mir auch, die Geißelzöpfe zu sehen, auf deren häufiges Vorkommen in Faulbrutmaterial Maaßen[1]) zuerst hingewiesen hat. Es machte sich eben auch hier wieder der Vorzug geltend, daß die zu untersuchenden, geformten Elemente des Präparates in einer wunderbar dünnen Schicht, sozusagen in einer mathematischen Ebene liegen. Diese zweckmäßige Verteilung des Materials und die starke Kontrastwirkung gegenüber der dunkeln Tuscheschicht bedingen ein so ausgeprägtes Bild der einzelnen Elemente, daß sich der

---

1) Maaßen, Alb., Arb. a. d. Kais. Biol. Anstalt f. Land- und Forstwirtschaft, Bd. VI, 1908, p. 53.

prinzipielle Nachteil nicht fühlbar macht, der dem Tuscheverfahren gegenüber dem Färbungsverfahren anhaftet und der darin besteht, daß die Tusche auf die einzelnen geformten Elemente des Präparates nicht elektiv wirkt, wie die Farbe, sondern daß sie alles, Bakterien, Gewebezellen, Fetttröpfchen etc. gleichmäßig weiß aufschimmern läßt. Die bei der Faulbrut der Biene gemachten günstigen Erfahrungen ließen mich hoffen, auch bei der Untersuchung von pathologischen Materialien anderer Art, speziell von Gewebesäften, die oft mit allerlei Nachteilen verbundenen Färbungsverfahren umgehen und allfällig vorhandene Mikroorganismen durch das bloße „Herausholen“ der Form auf Grund ihres Kontrastes gegen die dunkle Tusche der mikroskopischen Betrachtung besser zugänglich machen zu können. Ich wählte als Beispiel die gerade wegen ihrer schwierigen Sichtbarmachung erst vor wenigen Jahren durch Schaudinn entdeckten Syphilisbakterien und hatte das Vergnügen, diese aus frischem Material[1]) in kürzester Zeit, d. h. in 2—3 Minuten, in charakteristischer Form aufs deutlichste im Tuschescheibchen darstellen zu können. Ein Photogramm des entsprechenden Präparates ist in Fig. 11 der Tafel III wiedergegeben. Wir werden demnach in Zukunft neben der Dunkelfeldbeleuchtung und der Giemsafärbung das Tuscheverfahren zum Nachweis der Syphilisbakterien mit in Betracht zu ziehen haben.

Von selbst stellt sich nach diesem Erfolg die Frage ein, ob das Tuschepunktverfahren nicht geeignet sein könnte, auch in anderen Fällen, in denen man bisher vergeblich nach Mikroorganismen suchte, solche nachzuweisen. Jedenfalls sind diesbezügliche Versuche verlockend und ich zweifle nicht daran, daß solche von berufener Seite in Angriff genommen werden.

4. Ist das Tuscheverfahren imstande, Bakteriengeißeln sichtbar zu machen?

Man könnte diese Frage als eine müßige bezeichnen, nachdem festgestellt worden ist, daß die den Punkt darstellende Tuschescheibe eine Dicke von ungefähr $1/2$ μ haben muß. In der Tat habe ich in Tuschepunkten, die Zellen der verschiedenen beweglichen Bakterien enthielten, keine Spur von Bewegungsorganen feststellen können. Abgesehen davon, daß nach allgemeiner Annahme die gewöhnlichen Bakteriengeißeln so dünn sind, daß sie außerhalb der Grenze des mikroskopischen Sehens liegen, müßten diese Gebilde unter der verhältnismäßig mächtigen Tuscheschicht begraben sein. Nun wäre es denkbar, daß wir die Geißeln durch irgendwelche inkrustierenden Substanzen oder durch Quellung verursachende Mittel verdicken könnten, ein Vorgang, der sich offenbar bei den meisten der üblichen Geißelfärbungsverfahren abspielt und der mit eine der Ursachen zur Sichtbarmachung dieser sonst so zarten Fäden bildet. Versuche in der betreffenden Richtung habe ich noch nicht angestellt. Jedenfalls müßte die Verdickung eine ganz beträchtliche sein, wenn die Bewegungsorgane die Tuscheschicht ähnlich den Bakterien überragen sollten. Nun ist aber, wie wir am Beispiel der Spirochaete pallida, des Spirillum parvum und anderer sehr dünner Organismen sehen können, das Emporragen dieser über die Tuscheschicht

1) Das Material verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Jadassohn, Direktor der Universitätsklinik für Hautkrankheiten in Bern.

nicht unerläßliche Bedingung für die Sichtbarmachung, und insbesondere läßt der Umstand, daß man bei Spirochaete pallida die Enden der Zelle bis in die feine Verjüngung verfolgen kann, die Hoffnung berechtigt erscheinen, daß unter sonst günstigen Verhältnissen noch Gebilde von 0,1 μ Dicke im Tuschescheibchen deutlich erkannt werden können.

Es ist übrigens nicht ausgeschlossen, daß noch Mittel gefunden werden, welche bewirken, daß die mittlere Schichthöhe der Tusche herabgedrückt werden kann und daß so durch erfolgreiche Bemühungen nach beiden Richtungen, d. h. durch Verdickung der Geißeln einerseits und Verminderung der Schichthöhe des Tuscherückstandes andererseits das Prinzip des Tuschepunktes auch für den Nachweis von Bakteriengeißeln anwendbar wird, mit anderen Worten daß die Geißeln der gewöhnlichen Bakterien ohne Färbung durch bloße Kontrastwirkung mit der dunkeln Umgebung sichtbar gemacht werden können.

Versuche, die darauf hinausgehen, die Dicke der Tuschescheibchen einzuschränken, halte ich nicht für aussichtslos. Die Mittel zur Erreichung des Ziels scheinen mir hauptsächlich in drei Richtungen zu liegen. Zunächst wären sie mechanischer Natur und müßten in Federn, bezw. Vorrichtungen bestehen, welche an und für sich geeignet sind, außerordentlich dünne Tuschescheibchen zu erzeugen [1]). Sodann wäre dieses Bestreben zu unterstützen durch Zusätze zur Tusche, welche den Mikroorganismen nicht schaden, aber die Oberflächenspannung der Tusche heruntersetzen. Endlich wäre die Gelatine selbst so zu beeinflussen, unter anderem vielleicht durch Herabminderung der Konzentration, daß eine darauf gebrachte kleine Tuschemenge sich auf eine möglichst große Fläche zu verteilen sucht.

Rückblick und Ausblick.

Den älteren auf die Gewinnung von Reinkulturen der Mikroorganismen gerichteten Bestrebungen, die das so bedeutungsvolle Ziel zum Teil auf irreführenden Wegen zu erreichen suchten, folgten vor ungefähr einem Vierteljahrhundert die klassisch gewordenen Verfahren von E. Chr. Hansen und R. Koch, welche für die Gebiete der Gärungsgewerbe und der Bakteriologie bahnbrechend wirkten. Während die Hansensche Methode der Hefereinzucht prinzipiell als Ausgangspunkt der Reinkultur nur eine im Nährboden isolierte, d. h. vereinzelt liegende Zelle anerkannte, bediente sich das Kochsche Verfahren, das sogenannte Plattenverfahren, ebenfalls einer auf weitgehende Zerteilung der Bakterienzellen im Nährboden gerichteten Verdünnung, doch mußte hier auf die Forderung, daß die Reinkultur nachweislich aus einer Zelle hervor-

1) Wenn es sich bei Anwendung des Tuscheverfahrens nicht um Gewinnung von Einzellkulturen handelt, so ist man selbstverständlich nicht an die nur mittels der Feder in guter Qualität herstellbaren Tuschepunkte gebunden. Der Tuscherückstand kann dann eine beliebige Flächenausdehnung haben und bei seiner Erzeugung ist nur darauf Rücksicht zu nehmen, daß die Schichthöhe eine möglichst geringe ist. Einige orientierende Versuche haben gezeigt, daß z. B. sehr brauchbare Tuschescheiben erhalten werden, wenn man einen Tropfen des keimhaltigen Tuschegemisches über eine stark geneigte Schicht erstarrter Gelatine fließen läßt. Auf diese Weise ließen sich prächtige Bilder von Jugendstadien der Coli-Kolonien erhalten.

Wo aber Bakterienentwicklung überhaupt nicht, sondern nur mikroskopischer Bakteriennachweis in Frage kommt, wird man eventuell die Gelatinefläche einfach durch die gut gereinigte Fläche eines Objektträgers oder Deckglases ersetzen können.

gegangen sei, verzichtet werden. Der Grund dieses Verzichtes lag in den außerordentlich geringen Dimensionen der Bakterien, die ein Auffinden einzelner Zellen im Nährboden unter den beim Plattenverfahren gegebenen Verhältnissen unmöglich machen. An Stelle der Gewißheit, daß die gewonnenen Reinkulturen die Nachkommenschaft einer einzelnen Zelle darstellen, trat hier die Wahrscheinlichkeit, die je nach der Zerteilungsfähigkeit des Keimmaterials eine mehr oder weniger große war.

In den Hansenschen und Kochschen Reinzüchtungsverfahren und ihren verschiedenen Abänderungen schien die Grenze des auf diesem Gebiet Erreichbaren festgelegt zu sein. Für die Hefepilze und andere verhältnismäßig große Organismen fiel sie mit dem gesteckten Ziel überhaupt zusammen, während für die Bakterien das Erreichbare mit dem Wünschbaren sich nicht ganz deckte. Es blieb ein nicht aufgelöster Rest, ein Mangel an Zuverlässigkeit übrig, der in einzelnen Fällen kaum eine Rolle spielte, in anderen Fällen hingegen schwer empfunden werden mußte.

Wie in dieser Schrift des näheren angeführt wurde und die Tatsache, daß bis heute eine zuverlässige Methode zur Herstellung von Bakterien-Einzellkulturen fehlte es bestätigt, war auf den bisher benützten Wegen nicht weiterzukommen. Nur die Einführung neuer Prinzipien konnte die Mittel an die Hand geben, die für die Reinzüchtung der Bakterien benutzten Methoden so zu vervollkommnen, daß sie die absolute Zuverlässigkeit erreichten, die ein Vorzug des Hansenschen Hefereinzüchtungsverfahrens ist.

Der grundsätzlich neue Weg, der zum Ziele führte, bestand in der völligen Trennung der für die Isolierung einerseits und die Entwicklung des isolierten Keims andererseits zu treffenden Maßnahmen. Durch den Umstand, daß die Isolierung streng für sich behandelt wurde, konnte ein Hilfsmittel herangezogen werden, das nach dem bisher befolgten Grundsatze der engen Verbindung von Isolierung und Entwicklung des Keimes ausgeschlossen schien. Dieses Hilfsmittel war gegeben in der flüssigen Tusche. Durch die Verwendung von flüssiger Tusche in der näher beschriebenen Weise waren namentlich drei Vorteile gewährleistet, welche für die Gewinnung von Bakterien-Einzellkulturen von größter Bedeutung sind: 1) Die mikroskopische Betrachtung der Bakterien war durch den zwischen den glashellen Bakterienzellen und der dunkeln sie umgebenden Tuscheschicht entstehenden Kontrast außerordentlich verschärft. 2) Durch die nach Belieben zu treffende Anordnung kleinster Tuschepunkte war die Möglichkeit gegeben, in einem leicht auffindbaren, eng begrenzten und daher leicht übersehbaren Feld das Vorhandensein eines einzelnen Keimes mit großer Zuverlässigkeit festzustellen. 3) Die Herstellung der Tuschepunkte auf der Oberfläche einer erstarrten Gelatineschicht hat neben anderen Vorteilen den im Gefolge, daß ein nur eine Zelle bergender Punkt an einem sterilen Glassplitterchen, das man auf ihn legt, samt dem Keim haften bleibt, so daß der letztere mit Hilfe des Splitterchens in einen beliebigen Nährboden und überhaupt in beliebige Entwicklungsbedingungen versetzt werden kann.

Diese drei Vorteile bedeuten aber die Wegräumung der wichtigsten Hindernisse, die bisher der Bakterien-Einzellkultur im Wege standen. Soweit noch Schwierigkeiten bestehen, sind diese weniger im Verfahren an sich, als in besonderen Umständen begründet, namentlich in solchen, welche bei gewissen Mikroorganismengruppen die Gewinnung von Reinkulturen überhaupt erschweren.

Für die allermeisten leicht kultivierbaren Arten ist heute die Herstellung von Einzellkulturen mit keinen ernstlichen Schwierigkeiten verknüpft, und es sollte in Zukunft im Laboratorium des Bakteriologen in gleicher Weise wie in jenem des Gärungsphysiologen üblich sein, nur mit absoluten Reinkulturen, d. h. mit solchen, die nachweislich aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind, zu arbeiten. Für alle Untersuchungen, welche Fragen der Variabilität, Mutation und Vererbung betreffen, bildet die Einzellkultur die einzig zuverlässige Grundlage. Insbesondere scheint die Bakterien-Einzellkultur auch dazu berufen, auf dem immer größere Ausdehnung annehmenden Gebiet der Verwendung reingezüchteter Gärungserreger eine wichtige Rolle zu spielen, denn nur sie bietet die Möglichkeit, unter den in den Dienst der Gärungspraxis (Rahmsäuerung, Käsereifung etc.) gestellten Bakterienrassen eine zielbewußte Auslese zu treffen.

Daß das Tuscheverfahren sich nicht bloß im Dienste der Bakterien-Einzellkultur als nützlich erweist, sondern noch verschiedene andere Anwendungen erlaubt, wurde im Schlußkapitel hervorgehoben. Die einzige Tatsache, daß die sonst so schwierig sichtbar zu machenden Syphilis-Spirochäten durch den mit der Tusche bewirkten Kontrast ohne jede Vorbehandlung aufs deutlichste dargestellt werden können, berechtigt zur Hoffnung, daß das hier beschriebene neue Untersuchungsprinzip bei entsprechender Vervollkommnung mit Erfolg auch bei der Bearbeitung anderer schwieriger Fragen der Mikrobiologie herangezogen werden dürfte.

Tafelerklärung.

Vorbemerkung. Es handelt sich bei sämtlichen Bildern um nicht retuschierte Aufnahmen, die unter Verwendung apochromatischer Objektive der Firma Zeiss-Jena vom Verf. hergestellt worden sind. Für alle Aufnahmen mit einer einzigen Ausnahme (Phot. 2 auf Taf. II) wurde ein Immersionssystem von 2 mm Brennweite und 1,30 Ap. zusammen mit Proj.-Ok. 2 benützt, im erwähnten Ausnahmefall ein Trockensystem von 3 mm Brennweite und 0,95 Ap.

Die Bilder zerfallen in zwei Gruppen. Bei der ersten (Tafel I und II umfassend), sollte jeweils der ganze Tuschepunkt in seiner natürlichen Umgrenzung zur Darstellung kommen, um dem Beschauer die Ueberzeugung zu vermitteln, daß hier jeder Zweifel bezüglich der Zuverlässigkeit der Isolierung ausgeschlossen ist. Um die Punkte in ihrer ganzen Ausdehnung wiedergeben zu können, mußte sich die Vergrößerung auf 1 : 500 beschränken.

Bei der zweiten Gruppe (Taf. III) handelte es sich darum, zu zeigen, wie deutlich und scharf die verschiedenen Bakterienformen sich durch das Tuscheverfahren darstellen lassen. Da es hier nicht auf die Wiedergabe des ganzen Tuschescheibchens ankam, wurden innerhalb des scharf abgebildeten Bezirks kreisförmige Ausschnitte gemacht. Die Vergrößerung wurde für diese Gruppe auf 1 : 800 gestellt.

Tafel I.

Labbildender Micrococcus (Erreger vorzeitiger Gerinnung der Milch).

Phot. 1. Eine Zelle im Tuschepunkt.

Phot. 2. Aus einer Zelle entstandene Kolonie (15 Stunden nach der Aussaat).

Tafel II.

Bact. coli (aus gärender Milch).

Phot. 1. Eine Zelle im Tuschepunkt.

Phot. 2. Aus einer Zelle entstandene Kolonie (15 Stunden nach der Aussaat).

Tafel III.

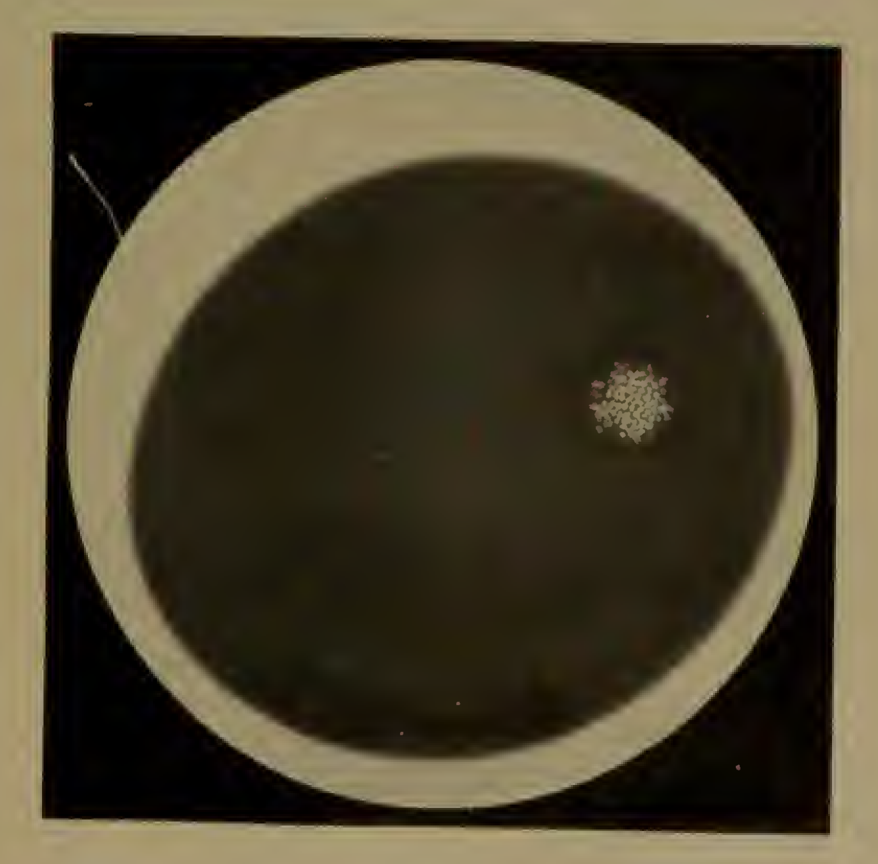
Zusammenstellung verschiedener Bakterienformen (nach Tuschepunkt-Canadabalsampräparaten).

1. Microc. pyogenes
2. Streptoc. mastitidis
3. Streptoc. Güntheri
4. Bact. coli
5. Bact. aërogenes
6. Bact. casei δ
7. Bact. casei ε
8. Bac. tetani
9. Bac. mycoides
10. Spirill. rubrum
11. Spiroch. pallida
12. Streptothrix alba.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 3546

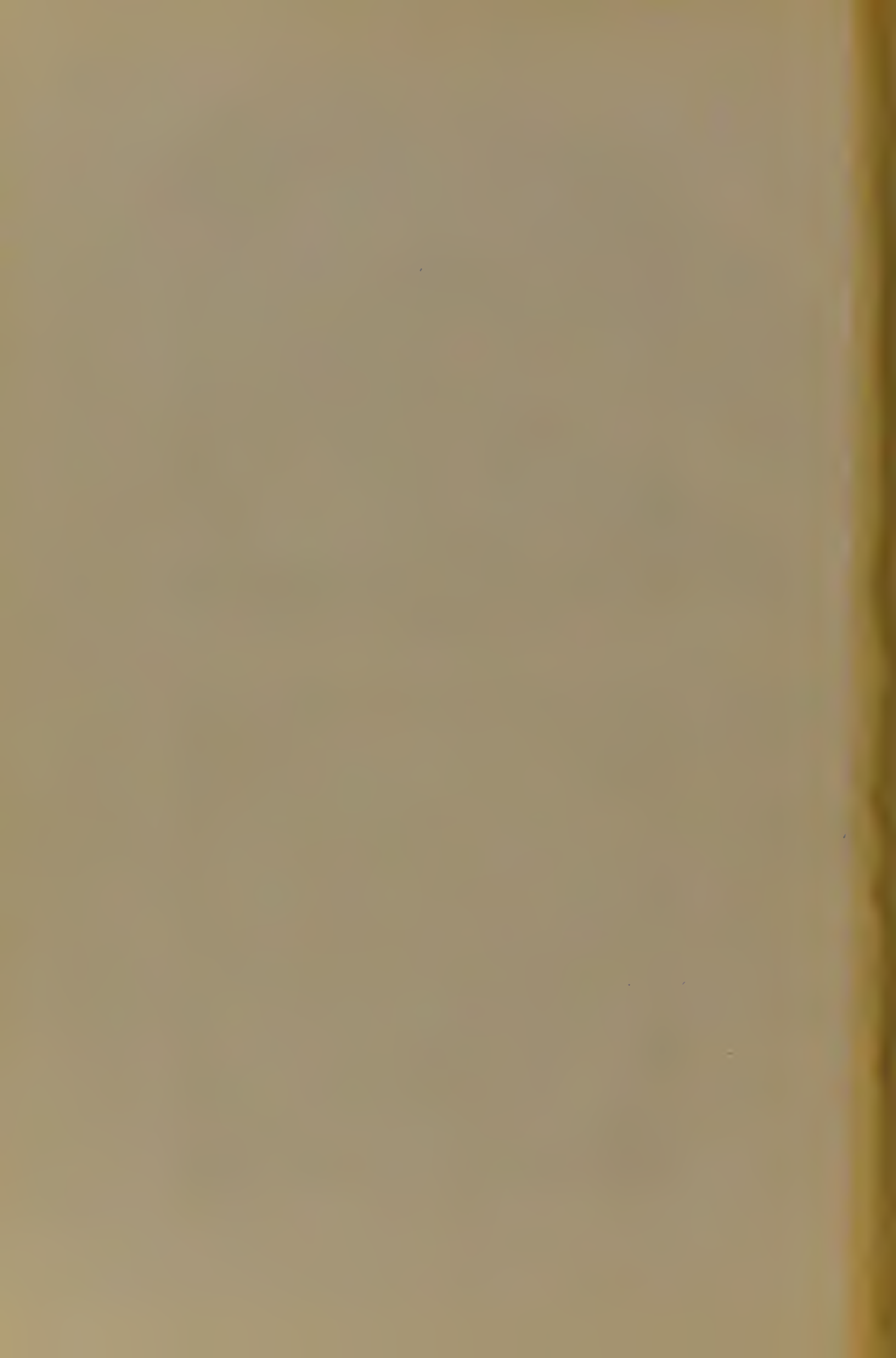


Phot. 1.



Phot. 2.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena**.



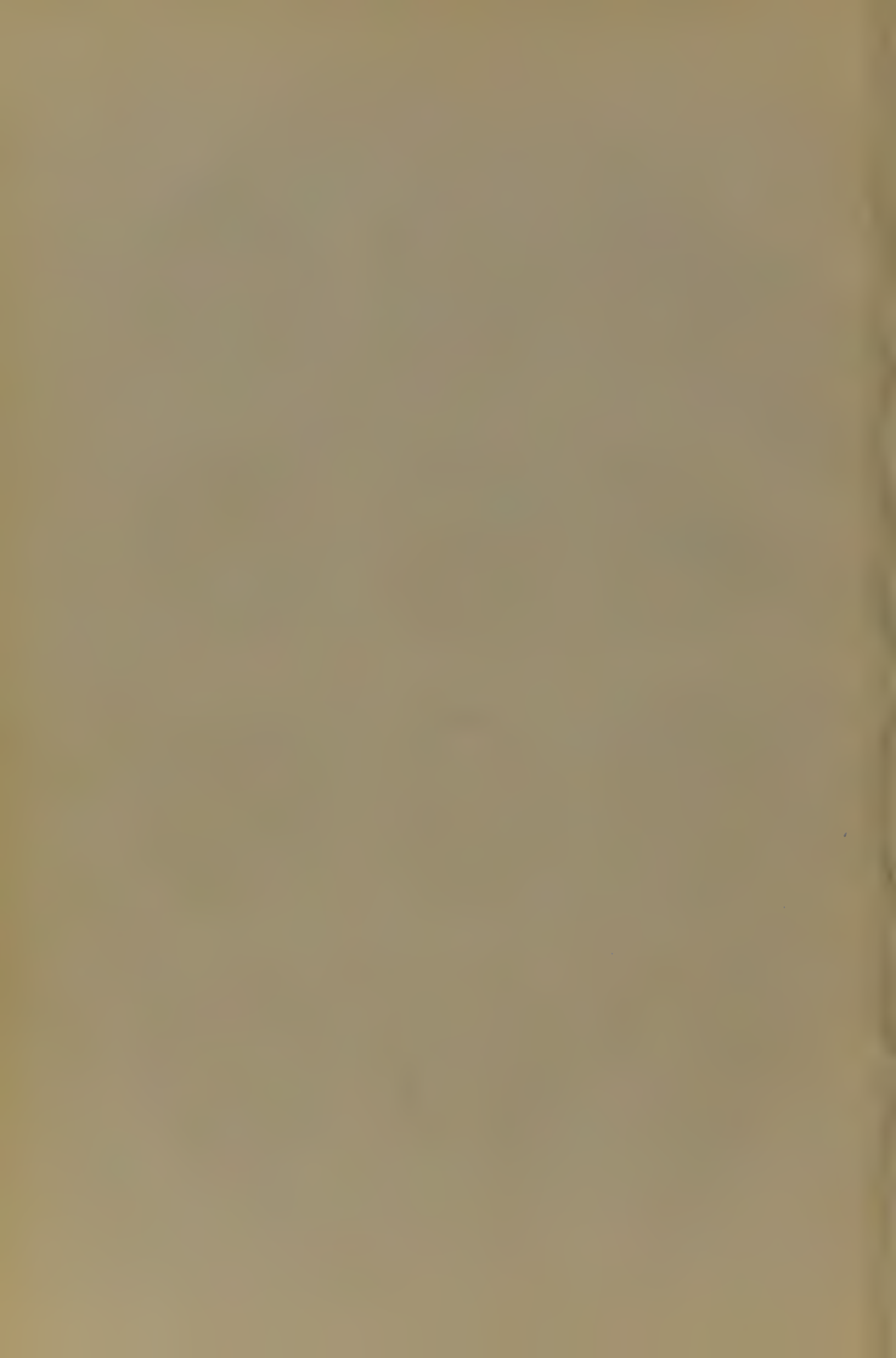


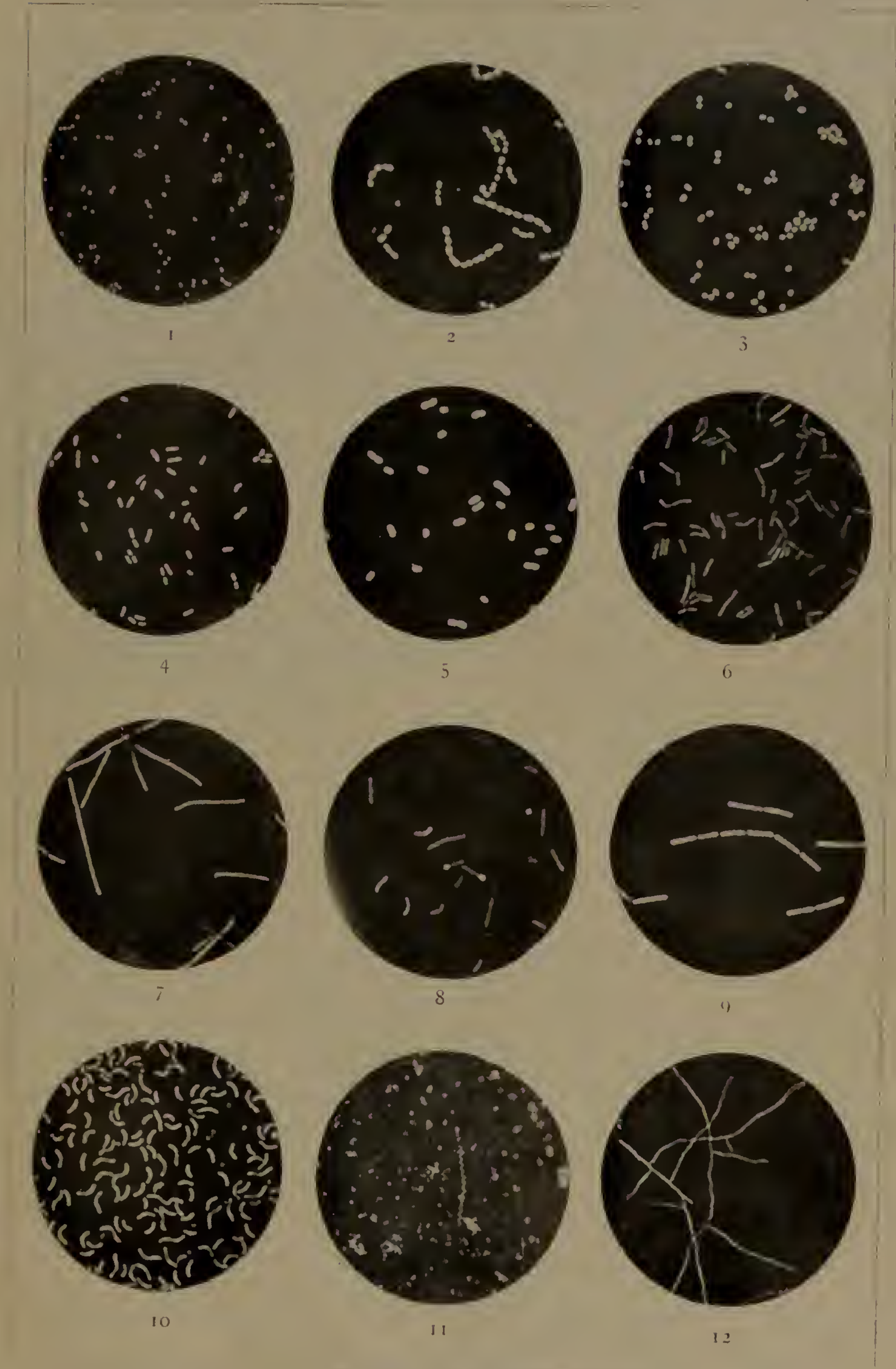
Phot. 1.



Phot. 2.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**





Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena**.

